

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 150 356**

② Número de solicitud: 009800900

⑤ Int. Cl.⁷: A01N 53/00

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **28.04.1998**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.11.2000**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.11.2000

⑦ Solicitante/s: **UNIVERSIDAD DE MURCIA**
Avda. Teniente Flomesta, s/n
Edificio Convalecencia, 3ª planta
30003 Murcia, ES

⑦ Inventor/es: **Del Río Conesa, José Antonio;**
Ortuño Tomás, Ana María;
García Puig, Damián y
Benavente-García García, Obdulio

⑦ Agente: **Ungría López, Javier**

⑤ Título: **Procedimiento para incrementar la producción de Nootkatona en frutos de *Citrus paradisi*.**

⑤ Resumen:
Procedimiento para incrementar la producción de Nootkatona en frutos de *Citrus paradisi*. Comprende la aplicación de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico a los frutos de *Citrus paradisi* seguido de posterior aplicación de Valenceno como precursor de la biosíntesis de Nootkatona por el fruto. La nootkatona tiene importantes aplicaciones en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica.

ES 2 150 356 A1

DESCRIPCION

Procedimiento para incrementar la producción de nootkatona en frutos de *citrus paradisi*.

Campo técnico de la invención

El sesquiterpeno denominado Nootkatona, juega un importante papel en el sector de las industrias agroalimentaria y cosmética, como aromatizante en alimentos y bebidas, así como en productos cosméticos y preparados farmacéuticos.

Dentro de este ámbito técnico, la presente invención proporciona un procedimiento para aumentar la producción de dicho sesquiterpeno en los frutos de *Citrus paradisi*.

Estado de la técnica anterior a la invención

Un grupo importante de productos naturales con interés comercial, son los aceites esenciales, en los que se incluyen a los mono y sesquiterpenos. Estos compuestos son ampliamente utilizados como aromatizantes en alimentos y bebidas, así como en productos de cosmética y preparados farmacéuticos.

Dentro de los aceites esenciales, un compuesto de gran interés industrial es la Nootkatona, un sesquiterpeno bicíclico aislado por primera vez del cedro de Alaska [(1) Erdtman e Hirose, 1962, Acta Chem. Scand 16:1311] y posteriormente detectado en aceite y zumo de pomelo [(2) MacLeod y Buiges 1964, J. Food Sci. 29:565568; (3) Wilson y Shaw 1980, J. Agric. Food Chem. 28:919922; (4) Del Rio y col. 1992, J. Agric. Food Chem. 40: 1488-1490], pummelo [(5) Sawamura y Kuriyama 1988, J. Agric. Food Chem., 36:567-569; (6) Ortuño y col, 1995, J. Agric. Food Chem. 43:1-5], naranjo amargo [(7) Boelens y Jiménez 1989, Flavour Fragrance J. 4:139142; (8) Del Rio y col. 1991, Plant Cell Rep. 10:410-413] y limón [(8) y (9) Del Rio y Ortuño 1994, Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 28. Medicinal and Aromatic Plants VII (Y.P.S, Bajaj, ed.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp.123138], siendo el componente que constituye mayoritariamente al aroma característico del pomelo [(10) Nursten 1979, Progress in Flavour Research (D.G. Land, H.E. Nurten, eds.), Applied Science, London] y del pummelo (5).

Dadas las múltiples aplicaciones de la Nootkatona como agente aromatizante en bebidas y refrescos (2) y perfumes [(11) Furia y Bellanca, 1975; Fenarolis handbook of flavor ingredients Vol. 2, 3rd edn. CRC Press, Cleveland, p.438] se han desarrollado diferentes métodos para la obtención por síntesis química de este compuesto.

La mayor parte de ellos utilizan el Valenceno como precursor, otro sesquiterpeno bicíclico presente en el aceite de naranja Valencia [(12) Hunter y Brogden, 1965, J. Food Sci, 30:876878] y se basan en la oxidación de este compuesto con cromato de tert-butilo o peracetato de tert-butilo [(12) y (13) Wilson y Shaw, 1978, J. Agric. Food Chem, 26: 1430-1432], o bien por fotooxidación del Valenceno [(14) Schulte-Elte y col. 1974, Swiss Pat. 553141]. Todos estos procesos requieren numerosas etapas para la síntesis y purificación final del compuesto.

Una alternativa a estos métodos, es la obtención de Nootkatona por cultivo de células "in

vitro". Sin embargo los rendimientos conseguidos por esta vía son muy bajos [(15) Drawert y col. 1984, Plant Cell Rep, 3:3740; y (8)].

En estudios previos el solicitante ha tipificado las especies y variedades de *Citrus* que tienen un nivel de producción de Nootkatona más alto (6). Así mismo, ha efectuado estudios en los que se ha establecido que la síntesis de dicho sesquiterpeno tiene lugar durante la fase de maduración-senescencia del fruto (4).

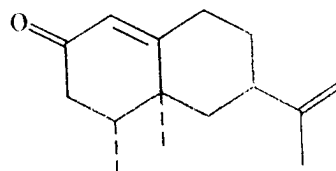
Frente a los inconvenientes anteriormente expuestos, la presente invención se basa en el desarrollo de un nuevo procedimiento para la aceleración de dicha fase en los frutos de pomelo, que tiene como resultado final el incremento en la síntesis de Nootkatona, y en consecuencia un alto rendimiento en la producción de dicho sesquiterpeno.

Descripción detallada de la invención

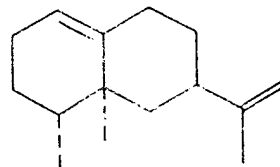
La presente invención, tal y como se indica en su enunciado, se refiere a un procedimiento para incrementar la producción de Nootkatona en frutos de *Citrus paradisi*, comúnmente conocido como pomelos.

La Nootkatona, principal constituyente del aroma en el aceite esencial del pomelo, es un sesquiterpeno bicíclico de gran interés industrial por sus aplicaciones en la industria agroalimentaria y cosmética, que alcanza un elevado precio en el mercado, en torno a los 5000 \$/kg. De aquí la importante repercusión del procedimiento de la presente invención en estos sectores, con el que se consigue un importante aumento en el nivel de producción natural de dicho producto por parte de los frutos de *Citrus paradisi*.

La nootkatona es exactamente la 5,6-dimetil-8-isopropenilbicyclo [4,4,0]-dec-1-en-3-ona de fórmula:



El Valenceno, su precursor corresponde a la siguiente fórmula:



El procedimiento de la presente invención se caracteriza por la aplicación de ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico a los frutos de *Citrus paradisi*, para estimular el proceso natural de maduración-senescencia de los mismos, etapa fisiológica a la que, como ya se ha indicado anteriormente, está ligada la expresión de la Nootkatona,

seguido de la aplicación de un precursor de la biosíntesis de la misma, a saber, el Valenceno, otro sesquiterpeno bicíclico.

La aplicación del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico, suele efectuarse pulverizando los frutos separados del árbol, en un determinado estado de maduración (correspondiente, al período de recogida de los frutos en el estado de madurez comercial), con una solución acuosa muy diluida de dicho producto. Si se desea, puede utilizarse un agente mojante, como por ejemplo, el polietilenglicol.

El precursor de la biosíntesis, es decir, el Valenceno, se aplica pasados unos días de la aplicación del ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico, mediante impregnación con una disolución del mismo. Es especialmente adecuado para los fines de la presente invención el empleo de una disolución de Valenceno en limoneno al 1% (peso/volumen), generalmente el período de tiempo que se deja transcurrir entre ambas aplicaciones es de unas 48 horas. La temperatura más adecuada para los fines pretendidos es de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

La principal ventaja del procedimiento de la presente invención frente a los procesos de síntesis química mencionados anteriormente, radica en haber conseguido incrementar considerablemente los procesos de síntesis "in vivo" de Nootkatona por parte de los frutos de *Citrus paradisi*. Este proceso "in vivo" permite conseguir un mayor rendimiento en el proceso de extracción de Nootkatona y un menor gasto en los procesos de purificación, sin los inconvenientes de los procesos de quimiosíntesis, debido a la presencia de impurezas o residuos de los reactivos utilizados y/o de

las posibles reacciones secundarias.

Aparte de las ventajas relativas al mayor rendimiento y pureza de la Nootkatona obtenida por el procedimiento de la presente invención, hay que destacar que el aceite esencial obtenido de los frutos de *Citrus paradisi* así tratados es de mejor calidad por tener un mayor contenido en dicho sesquiterpeno y que los frutos destinados a su consumo fresco presentan excelentes cualidades organolépticas, en cuanto a aroma y sabor.

Modos de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante el siguiente Ejemplo, el cual no pretende ser limitativo de su alcance.

Ejemplo

Se separan frutos de *Citrus paradisi* del árbol una vez transcurridas 40 semanas después de la antesis y se pulverizan con una solución acuosa de Acido 1-aminociclopropano-1-carboxílico, a la concentración de 1.000 ppm, utilizando como agente mojante polietilenglicol a la concentración de 0,1%.

Transcurridas 48 horas se procede a la impregnación de dichos frutos con Valenceno, a una concentración del 1% (diluido en limoneno). Los frutos así tratados se mantienen en cámara durante 5 días a 25°C , condiciones en las que se produce la activación de la ruta metabólica y la máxima síntesis de Nootkatona, alcanzando concentraciones de 170 mg/100 g de peso fresco de corteza, y obteniéndose un aceite esencial con un contenido en Nootkatona 6 veces superior al obtenido en frutos no tratados.

El análisis de la Nootkatona producida se realiza por Cromatografía de Gases, siguiendo el procedimiento descrito por Del Río y col. 1992 (2).

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para incrementar la producción de Nootkatona en frutos de *Citrus paradisi*, **caracterizado** porque se aplica ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico a frutos de dicha planta separados de la misma, tras lo cual se aplica Valenceno como precursor de la biosíntesis de Nootkatona por el fruto.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el fruto se separa del árbol 40 semanas después de la antesis.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico se aplica en forma de disolu-

ción acuosa.

4. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el Valenceno se aplica en forma de disolución en limoneno.

5. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque entre una y otra aplicación se dejan transcurrir 48 horas.

6. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque después de la segunda aplicación se mantienen los frutos tratados en una cámara a $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, **caracterizado** porque dichos frutos se mantienen en la cámara durante un período de tiempo de 5 días.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: A01N 53/00

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| A | GARCIA PUIG, D. et al.: "Effect of ethylene on naringin, narirutin and nootkatone accumulation in grapefruit", <i>Planta Medica</i> , (1995), Vol. 61, n° 3, páginas 283-285, ISSN: 0032-0943. | |
| A | TOMAS, A.O. et al.: "Influence of ethylene and ethephon on the sesquiterpene nootkatone production in <i>Citrus paradisi</i> ", <i>J. Agri. Food Chem.</i> , (1993), Vol. 41, n° 10, páginas 1566-1569, ISSN: 0021-8561. | |
| A | GARCIA PUIG, D. et al.: "Effect of ethylene on sesquiterpene nootkatone production during the maturation-senescence stage in grapefruit (<i>Citrus paradisi</i> Macf.) en <i>Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture</i> , Volumen 16, (1993), páginas 146-147. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. ISBN: 0-7923-2169-3. | |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe

09.10.2000

Examinador

A. Maquedano Herrero

Página

1/1