



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 810**

51 Int. Cl.:  
**A23D 9/007** (2006.01)  
**A23L 1/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05816182 .9**  
96 Fecha de presentación : **07.11.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1842429**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.10.2007**

54 Título: **Mezcla oleosa de ingredientes bioactivos naturales para la preparación de un producto alimenticio enriquecido.**

30 Prioridad: **16.11.2004 ES 200402755**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**09.06.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**09.06.2011**

73 Titular/es: **Universidad Autónoma de Madrid  
Ciudad Universitaria de Cantoblanco  
c/ Einstein, 3  
28049 Madrid, ES  
EMBUTIDOS FRIAL, S.A.**

72 Inventor/es: **Reglero Rada, G.;  
Señorans Rodríguez, J.;  
Ibáñez Ezequiel, E.;  
Santoyo Díez, S.;  
Torres Olivares, C.;  
Jaime de Pablo, L.;  
Soler Rivas, C.;  
Rodríguez García-Risco, M.;  
Marín Martín, F.;  
Ruiz Rodríguez, A. y  
Frial Suárez, P.**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 360 810 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

Mezcla oleosa de ingredientes bioactivos naturales para la preparación de un producto alimenticio enriquecido

### Campo de la invención

5 La presente invención pertenece al campo de los productos alimenticios enriquecidos con ingredientes bioactivos naturales. Más en particular, se refiere a una mezcla oleosa a base de ingredientes bioactivos naturales que se añade a productos alimenticios, particularmente a productos cárnicos, a fin de compensar eficazmente el desequilibrio lipídico de los productos alimenticios de origen animal terrestre y aportar efectos beneficiosos para la salud humana, especialmente en la prevención de enfermedades, sin detrimento de las características de calidad y seguridad de dichos productos alimenticios.

### 10 Antecedentes de la invención

En el mercado existen desde hace unos años diversos productos alimentarios de origen animal, principalmente lácteos (aunque también algunos cárnicos), con ácidos grasos poliinsaturados omega-3 ( $\omega$ -3) incorporados al alimento mediante la adición de un porcentaje bajo de aceite de pescado. Los ácidos grasos  $\omega$ -3 no están presentes de forma natural en la carne de los animales terrestres y con su incorporación a los alimentos de origen animal se persiguen beneficios saludables que se basan en conocimientos científicos de hace muchos años.

15 Tradicionalmente, la grasa animal ha sido considerada poco saludable. Su composición lipídica se ha relacionado desde hace décadas con la probabilidad de sufrir enfermedades cardiovasculares. De hecho, la leche entera y los productos cárnicos suelen desaconsejarse en las dietas de las personas sometidas a riesgo cardiovascular. Desde hace muchos años se investiga al respecto para tratar de conocer cuáles son las bases científicas de ello. Las teorías al respecto han ido evolucionando notablemente, especialmente en el periodo más reciente. Durante años, se ha considerado a la grasa animal responsable del incremento de los niveles de colesterol sérico y se ha establecido una asociación directa del nivel de colesterol con la enfermedad cardiovascular. Más recientemente se atribuye a los triglicéridos, concretamente a su concentración en la sangre y al tiempo de permanencia en la misma, el origen del factor de riesgo cardiovascular.

25 Desde mediados del siglo pasado se llevan a cabo investigaciones orientadas a conocer los efectos de los ácidos grasos poliinsaturados o PUFA (PolyUnsaturated Fatty Acids) en la disminución de los niveles de colesterol sérico y en las enfermedades cardiovasculares. Los trabajos más relevantes en este sentido fueron los de Ahrens et al, 1954 (Ahrens E.H., D.H. Blankenhorn, T.T. Tastas (1954), "Effect on human serum lipids of substituting plant for animal fat in the diet", Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 86, 872.) y Keys et al., 1957 (Keys A., J.T. Anderson, F. Grande (1957), "Serum cholesterol response to dietary fat", Lancet 1, 787) que establecieron evidencias claras acerca de la importancia de los PUFA en la prevención de enfermedades cardiovasculares. Desde entonces se han llevado a cabo multitud de estudios al respecto, la mayoría de los cuales han confirmado los efectos cardiosaludables de los  $\omega$ -3. Por ejemplo, en un ensayo clínico llevado a cabo recientemente por investigadores del Laboratory of Cardiovascular Nutrition del Baker Medical Research Institute de Melbourne, el Department of Medicine del Medical Defense College de Tokio, el CSIRO de la Division of Health Sciences and Nutrition de Adelaide (Australia) y de Vitamin Research de F Hoffmann-La Roche (Suiza) publicado en el American Journal of Clinical Nutrition (Am J Clin Nutr 76 (2002) 326-330) de la American Society for Clinical Nutrition, se demuestra que los ácidos grasos  $\omega$ -3, especialmente los de cadena larga, es decir, DHA (ácido docosahexanoico) y EPA (ácido eicosapentanoico), pueden ayudar en el mantenimiento de la elasticidad arterial y en consecuencia del mantenimiento de los niveles normales de la presión arterial y de la reducción del riesgo cardiovascular. El estudio consistió en suministrar DHA o EPA o placebo a pacientes con hipercolesterolemia durante siete semanas. Los investigadores determinaron, a continuación, la elasticidad de las arterias de los participantes a través de ultrasonidos. Aquellos que recibieron los ácidos grasos  $\omega$ -3 mostraron una reducción significativa en la esclerosis arterial, mientras que los que tomaron el placebo no experimentaron cambios. Los que tomaron EPA presentaron un aumento del 36% en la resistencia sistémica arterial, una determinación de la elasticidad de las arterias principales, mientras que los que tomaron DHA tuvieron un aumento del 27%.

50 Los ácidos grasos  $\omega$ -3 (EPA/DHA) mejoran el perfil lipídico sanguíneo, ya que aumentan la elasticidad, disminuyen el colesterol LDL, aumentan el HDL, reducen la trigliceridemia arterial y son antitrombóticos. Adeemia (López-Huertas-E; Baro,-L; Carrero,-J-J; Fonolla,-J (2003) "n-3 fatty acids: health effects and opportunities to increase intake", Agro Food Industry hi tech. 2003; 14(3): 18-21; Dewailly,-E; Blanchet,-C; Gingras,-S; Lemieux,-S; Holub,-B-J (2002), "Cardiovascular disease risk factors and n-3 fatty acid status in the adult population of James Bay Cree", American-Journal-of-Clinical-Nutrition. 2002; 76(1): 85-92).

55 Además de los efectos cardiosaludables de los  $\omega$ -3, y tal como se ha comentado en párrafos anteriores, estos ácidos grasos tienen importantes efectos en la expresión génica y otros procesos bioquímicos corporales. Una de las funciones más importantes de los  $\omega$ -3 es la formación de las membranas celulares. La mayor parte de los tejidos cerebrales son ricos en ácidos grasos  $\omega$ -3. El estado actual del conocimiento de estos efectos se recoge en un artículo de Donald B. Jump del Department of Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology de Michigan State

University publicado en el Journal of Biological Chemistry de la American Society for Biochemistry and Molecular Biology (J. Biol. Chem 227 (2002) 8755–8758).

5 Hoy se conoce que los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA)  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 están involucrados en importantes procesos biológicos del cuerpo humano y que su relación es clave en la prevención de numerosas enfermedades crónicas (Simopoulos A.P. (2002), "The importance of the ratio omega-6/omega-3 essential fatty acids", Biomedicine and Pharmacotherapy 56, 365), incluyendo el cáncer (Nkondjock A., B. Shatenstein, P. Maisonneuve, P. Ghadirian (2003), "Specific fatty acids and human colorectal cancer: an overview", Cancer Detection and Prevention 27, 55). Se recomienda que dicha relación sea próxima a 1 (Simopoulos A.P. (1999), "Evolutionary aspects of omega-3 fatty acids in the food supplí Prostaglandins, Leucotrienes and Essential Fatty Acids", 60, 421). La relación  $\omega$ -6 /  $\omega$ -3 en la carne de cerdo es, como término medio, superior a 10 y en la grasa de cerdo aún es mayor. En cualquier caso muy superior a la recomendada.

10 Existe un interesante trabajo de investigación de A.P. Simopoulos [Biomedicine & Pharmacotherapy 56 (2002) 365-379] en el que concreta los beneficios que aportan diferentes relaciones  $\omega$ -6/ $\omega$ -3. Según este trabajo:

$\omega$ -6/ $\omega$ -3= 5, tiene efectos beneficiosos sobre el asma.

15  $\omega$ -6/ $\omega$ -3= 4, tiene probados efectos de reducción del riesgo cardiovascular.

$\omega$ -6/ $\omega$ -3= entre 2 y 3, previene el cáncer de colon y la artritis reumatoide.

Cuanto más baja sea la relación  $\omega$ -6/ $\omega$ -3, mayor efecto preventivo de cáncer de mama.

$\omega$ -6/ $\omega$ -3 superior a 10 comienza a tener efectos adversos.

20 La compensación de los efectos negativos de los  $\omega$ -6 mediante la adición de  $\omega$ -3 requiere, para ser efectiva, la adición simultánea de compuestos de actividad antioxidante [B. Demmig-Adams y W.W. Adams, III. [Science 298 (2002) 2149-2153].

25 Las propiedades antioxidantes de las especias se conocen desde comienzos de los años 50 (Chipault J.R., Muzumo G.R., Hawkins J.M., Lundberg W.O. (1952), "The antioxidant properties of natural spices", Food Res. 17, 46). En 1955 se descubrió que el romero era una de las que poseían esta actividad en mayor medida (Rac M., Ostric-Matijasevic B. (1955), "The properties of rosemary as an antioxidant", Rev. Fr. Corps Gras 2, 796). Los compuestos responsables de la misma están bien determinados. En 1966 se aisló el carnosol (Briescorn C.H., Fuchs A., Bredenbergh J.B., McChesney J.D., Wenkert E. (1966), "The structure of carnosol", J. Org. Chem. 29, 2293) y se atribuyeron a este diterpeno fenólico las propiedades antioxidantes de la planta. Su estructura y la del ácido carnósico fueron confirmadas en 1982 (Wu J.W., Lee M.H., Ho C.T., Chan S.S. (1982), "Elucidation of the chemical structures of natural antioxidants isolated from Rosemary", JAOCS 59, 339) y en ese mismo año se identificaron el rosmanol y el ácido rosmarínico (Inatani R., Nakatani N., Fuwa H., Seto H. (1982), "Structure of a new antioxidative phenolic diterpene isolated from Rosemary", Agric. Biol. Chem. 46, 1666). A continuación el rosmadial (Inatani R., Nakatani N., Fuwa H. (1983), "Antioxidative effect of the constituents of Rosemary and their derivatives", Agric. Biol. Chem. 47, 521), el epirosmanol e isorosmanol (Nakatani N., Inatani R. (1984), "Two antioxidative diterpenes from Rosemary and a revised structure for rosmanol", Agric. Biol. Chem. 48, 2081) el rosmaridifenol y la rosmariquinona (Houlihan C.M., Ho C.T., Chang S.S. (1985), "The structure of rosmariquinone. A new antioxidant isolated from Rosmarinus officinalis L.", JAOCS 62, 1985). Además de los anteriores compuestos, se sabe que las hojas de romero contienen también flavonoides con actividad antioxidante (Okamura N., Haraguchi H., Hashimoto K., Yagi A. (1994), "Flavonoids in Rosmarinus officinalis leaves", Phytochem. 37, 1463).

40 En términos generales, y considerando estos compuestos de forma individual, la mayor actividad antioxidante corresponde al ácido carnósico, seguido del carnosol, ácido rosmarínico, rosmanol y rosmadial (Cuvelier M.E., Richard H., Berset C. (1996), "Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary", JAOCS 73, 645). El carnosol es el componente que generalmente se ha detectado como mayoritario, llegando a suponer muchas veces el 90% de los extractos. En realidad procede, junto con otros compuestos fenólicos encontrados en el romero, de la oxidación del ácido carnósico durante las operaciones de extracción.

45 Los diterpenos fenólicos del romero actúan como antioxidantes primarios (Basaga H., Tekkaya C., Acikel F. (1997), "Antioxidative and free radical scavenging properties of rosemary extract", Lebensm. Wiss. Technol. 30, 105; Frankel E.N., Shu W.H., Aeschbach R., Prior E. (1996), "Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid in bulk oil and oil-in-water emulsion", J. Agric. Food Chem. 44, 131; y Haraguchi H., Saito T., Okamura N., Yagi A. (1995), "Inhibition of lipid peroxidation and superoxide generation by diterpenoids from Rosemary officinalis", Planta Medica 61, 333). Además, se ha demostrado que, estos productos tienen una actividad similar a la superóxido dismutasa (Seok J.K., Daeseok H., Kwang D.M., Joon S.R. (1995), "Measurement of superoxide dismutase-like activity of natural antioxidants", Biosci. Biotechnol. Biochem. 59, 822) y efectos sinérgicos con las enzimas glutatión reductasa y NADPH-quinona reductasa, regenerándolas y aumentando el efecto bloqueante de radicales libres que ejercen. A estas sinergias con las mencionadas enzimas se atribuyen

los efectos protectores ante agentes cancerígenos en pulmón, hígado y estómago que se han puesto de manifiesto en ratones en los últimos años (Singletary K.W., Rokusek J.T. (1997), "Tissue specific enhancement of xenobiotic detoxification enzymes in mice by dietary rosemary extract", *Plant Foods for Human Nutrition* 50, 47; Offord, E.A., K. Macé, O. Avanti, A.M.A. Pfeifer (1997), "Mechanisms involved in the chemoprotective effects of rosemary extract studied in human liver and bronchial cells", *Cancer Letters* 114, 275). Es también conocido el mecanismo de acción de los antioxidantes contra la peroxidación de las lipoproteínas en sangre que es clave en el desarrollo de la arteriosclerosis (Pinchuk I., D. Lichtenberg (2002), "The mechanism of action of antioxidants against lipoprotein peroxidation, evaluation based on kinetic experiments", *Progress in Lipid Research* 41, 279).

El romero es muy conocido en usos alimentarios. Sin embargo, su intenso aroma y la alteración de la textura hacen que no pueda añadirse a los productos cárnicos en la proporción necesaria para que su efecto sea apreciable. Por este motivo se emplean extractos.

La extracción supercrítica es una alternativa ventajosa a la extracción con disolventes para la obtención de antioxidantes. Existen varios procesos de extracción de aromas y colorantes naturales, lúpulo y oleorresinas de diversas plantas. La extracción en condiciones suaves y no oxidantes permite obtener productos de alta calidad con sus propiedades naturales intactas y exentos de residuos de disolventes.

Destaca el caso de las oleorresinas que, generalmente, se pueden fraccionar en el mismo proceso de extracción supercrítica dando lugar a productos de funcionalidades diferentes. Numerosas aplicaciones se han realizado a la extracción de plantas labiadas (romero, tomillo, orégano, salvia, etc.) (Nguyen U., Evans D.D., Frakman G. (1994), "Natural antioxidants produced by supercritical fluid extraction", In "Supercritical Fluid Processing of Foods and Biomaterials", Ed. S.S.H. Rizvi. Chapman & Hall, London. p.103). En estos casos, mediante extracción con fluidos supercríticos o SFE (Supercritical Fluid Extraction) se obtiene una oleorresina fácilmente fraccionable en dos productos: un aceite esencial, generalmente con funcionalidades aromática y antimicrobiana, y un antioxidante.

En las actualidad se conoce bien que los antioxidantes naturales obtenidos por SFE poseen una actividad mayor que los extraídos con disolventes. Djarmati y colaboradores (Djarmati Z., Jankov R.M., Schwirtlich E., Djulinac B., Djordjevic A. (1991), "High antioxidant activity of extracts obtained from sage by supercritical CO<sub>2</sub> extraction", *JAOCs* 68, 731) demostraron que los extractos antioxidantes de salvia obtenidos por extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico eran más eficaces que el BHT. Más recientemente se ha confirmado que lo mismo ocurre con los extractos de pimienta negra (Tipsrisukond N., Fernando L.N., Clarke A.D. (1998), "Antioxidant Effects of Essential Oil and Oleoresin of Black Pepper from Supercritical. Carbon Dioxide Extractions in Ground Pork", *J. Agric. Food Chem.* 46, 4329).

Los fitoquímicos contenidos en el extracto antioxidante de romero tienen importantes actividades biológicas. Es especialmente interesante su efecto sobre los ácidos grasos insaturados.

Asimismo, son conocidas en el estado de la técnica las propiedades beneficiosas de la microalga *Dunaliella salina*, alga unicelular perteneciente al género de las microalgas verdes (clorofitas). Esta microalga fue la primera que se utilizó comercialmente para producir reactivos de química fina debido a que su extrema salinidad simplificaba en gran manera el mantenimiento de los cultivos, sin temor a contaminaciones externas por patógenos (Borowitzka L.J., Moulton T.P., Borowitzka M.A. (1985), "Salinity and the commercial production of beta-carotene from *Dunaliella salina*", In: Barclay W.J., McIntosh R., eds. *Algal Biomass: and Interdisciplinary Perspective*. J. Cramer Verlag, Verduz). En la actualidad la *Dunaliella salina* se consume como suplemento alimentario rico en beta-caroteno (Mokady S., Abramovici A., Cogan U. (1989), "The safety evaluation of *Dunaliella bardawil* as a potential food supplement", *Food Chem. Toxicol.* 27, 221; Tanaka Y. (1990), "Process for production of encapsulated foodstuff containing *Dunaliella* algae", patente estadounidense US 4,915,965, y patente japonesa JP 88-40755; Leach G., Oliveira G., Morais R. (1998), "Spray-drying of *Dunaliella salina* to produce a beta-carotene rich powder", *J. Ind. Microb. Biotechnol.* 20, 82; Orset S., Leach G.C., Morais R., Young A.J. (1999), "Spray-drying of the microalga *Dunaliella salina*: Effects on beta-carotene content and isomer composition", *J. Agric. Food Chem.* 47, 4782). Australia es el productor de más del 80% del beta-caroteno que se consume en el mundo, todo él procedente de cultivos de *Dunaliella salina*. El beta-caroteno se encuentra en esta microalga en concentraciones de hasta un 14% del peso seco de la misma, siendo el alga de mayor contenido en este compuesto y dependiendo su acumulación de las condiciones de cultivo (salinidad, temperatura, intensidad de luz). Estudios recientes han permitido el aislamiento y purificación de distintos isómeros del beta-caroteno, como el 9-cis (Yamano Y., Yoshizawa M., Ito M. (1999), "Isolation of 9Z beta-carotene from *Dunaliella bardawil* and its stereoselective synthesis", *J. Nutr. Sci. Vitamin.* 45, 49) y han determinado su actividad antioxidante en comparación con el beta-caroteno sintético (de composición mayoritariamente "todo-trans"). Otros compuestos con propiedades funcionales presentes en esta microalga son los tocoferoles (que habitualmente se cuantifican como alfa-tocoferol debido a que se desconoce su composición isomérica), los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) (Franke H., Springer M., Pulz O., Tietz U., Mueller U. (1994), "Polyunsaturated fatty acids from microalgae", *Int. Food Ingr.* 4,41), esteroides (como ergosterol) y vitaminas hidrosolubles (como tiamina, piridoxina, biotina, riboflavina, etc.). No se ha descrito en esta alga la presencia de flavonoides o compuestos fenólicos aunque es esperable teniendo en cuenta que se ha detectado su presencia en especies parecidas de microalgas (Rauha, JP; Remes, S; Heinonen, M; Hopia, A; Kähkönen, M; Kujala, T; Pihlaja, K; Vuorela, H; Vuorela, P. (2000), "Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds", *Int. J. Food Microbiol.* 56, p. 3-12).

En cuanto al efecto de los carotenoides, además de lo ya conocido, muy recientemente se han demostrado efectos de carotenoides como la luteína, por ejemplo, en la prevención de la degeneración macular asociada a la edad. Estos efectos son más pronunciados si se combinan dichos carotenoides con otros antioxidantes no carotenoides (Beatty S et al. *Surv. Ophthalmol* 2000; 45:115-134; Cait et al. *Prog Retin Eye Res* 2000; 10:205-211), (Junqueira VB et al. *Mol Aspects Med* 2004;25:5-16) (Koh HH et al. *Experimental Eye Research* 2004; 79:21-27; Beatty S et al. *Arch Biochem Biophys* 2004;430:70-76).

Por último, el alfa-tocoferol es conocido en el estado de la técnica por sus efectos beneficiosos como antioxidante, tanto desde el punto de vista alimentario como a nivel corporal.

Los presentes inventores han descubierto ahora que la combinación de aceite de salmón enriquecido con ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3 de cadena larga tal como EPA y DHA, alfa-tocoferol y extracto supercrítico de romero para su posterior adición a un producto alimenticio da como resultado una acción sinérgica inesperada entre los antioxidantes y los ácidos grasos poliinsaturados que se traduce en un aumento de la actividad antioxidante mucho mayor de lo esperado y, además, en el mantenimiento de los contenidos de las sustancias bioactivas durante la elaboración, conservación y cocinado de los productos alimenticios enriquecidos, con los consiguientes beneficios para la salud humana por el consumo de los mismos.

Así pues, la presente invención proporciona una composición oleosa sinérgica a base de aceite de salmón enriquecido con EPA y DHA, alfa-tocoferol y extracto supercrítico de romero para usar en la preparación de un producto alimenticio enriquecido. Dicha composición puede comprender, además, microalga *Dunaliella salina*, que contiene también componentes beneficiosos para la salud tales como los carotenoides luteína o beta-caroteno, por ejemplo.

Asimismo, la invención proporciona productos alimenticios enriquecidos con dicha mezcla oleosa que presentan una relación de ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 inferior a 5, ventajosa para la prevención de enfermedades tales como el asma, el cáncer, o diversas dolencias cardiovasculares. Dicha relación, además, se mantiene también durante la elaboración, conservación y cocinado del producto alimenticio enriquecido debido a la mencionada acción sinérgica de dichos ácidos grasos poliinsaturados con el alfa-tocoferol y los diterpenos fenólicos procedentes del extracto supercrítico de romero. Dichos alimentos enriquecidos conservan, además, sus características de calidad en cuanto a valoración sensorial, así como sus características de seguridad.

Por tanto, el producto enriquecido proporcionado por la invención presenta grandes beneficios para la salud humana tanto por su contenido estable en ácidos grasos poliinsaturados con una relación  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 inferior a 5, como por su contenido estable en alfa-tocoferol, diterpenos fenólicos procedentes del extracto supercrítico de romero y, opcionalmente, carotenoides procedentes de la microalga *Dunaliella salina*.

#### **Objeto de la invención**

La presente invención, por tanto, tiene por objeto proporcionar una mezcla oleosa sinérgica a base de ingredientes bioactivos naturales para usar en la preparación de un producto alimenticio enriquecido que comprende aceite de salmón enriquecido con EPA y DHA, alfa-tocoferol y extracto supercrítico de romero. Otro objeto de la presente invención es proporcionar un producto alimenticio enriquecido con dicha mezcla oleosa a base de ingredientes bioactivos naturales.

Por último, otro objeto de la presente invención es proveer un procedimiento para la preparación de dicho producto alimenticio enriquecido.

#### **Descripción detallada de la invención**

La presente invención proporciona una mezcla oleosa a base de ingredientes bioactivos naturales para usar en la preparación de un producto alimenticio enriquecido, caracterizada porque comprende aceite de salmón enriquecido en EPA y DHA, alfa-tocoferol y extracto supercrítico de romero.

En el contexto de la presente solicitud, la expresión "producto alimenticio enriquecido" se refiere a un producto de uso alimentario a cuya composición se han añadido sustancias que de modo natural no contiene o que las contiene en concentraciones bajas.

Asimismo, la expresión "ingredientes bioactivos naturales" hace referencia a sustancias de origen natural con actividades biológicas beneficiosas para la salud según el estado actual del conocimiento científico.

Tal y como se ha comentado previamente, el aceite de salmón enriquecido en EPA (ácido eicosapentanoico) y DHA (ácido docosahexanoico) proporciona ácidos grasos poliinsaturados omega-3, ingredientes funcionales muy conocidos y empleados en el ámbito alimentario, por lo que su utilización es de muy bajo riesgo. La incorporación de ácidos grasos  $\omega$ -3 sirve para compensar el perfil lipídico desfavorable de la grasa de animales terrestres, particularmente de cerdo, ya que la ingesta de cerdo provoca un incremento de ácidos grasos  $\omega$ -6. La intervención de dichos ácidos grasos  $\omega$ -6 en desequilibrios redox a nivel celular puede conducir a un incremento de la proliferación celular, como es el caso de cáncer; al desencadenamiento de procesos inflamatorios, como es el caso

de enfermedades cardiovasculares, autoinmunes y neurológicas; y a deficiencias en la neurotransmisión provocando desórdenes neurológicos. Asimismo, el equilibrio redox celular influye en la expresión génica de reguladores de procesos vitales y en la generación de daños al DNA que dan lugar a mutaciones en genes claves.

5 Así pues, la adición de aceite de salmón enriquecido en EPA y DHA a productos alimenticios de origen animal terrestre que se desean enriquecer contribuye a compensar el desequilibrio natural  $\omega$ -6 /  $\omega$ -3 de los mismos, ya que, por ejemplo, la relación  $\omega$ -6 /  $\omega$ -3 en la grasa de animales terrestres como cerdo y pavo es, como término medio, superior a 10 (si bien la carne de pavo sólo presenta un 1% de contenido graso frente al 40% de contenido graso de la carne de cerdo). En la grasa de cerdo la relación  $\omega$ -6 /  $\omega$ -3 aún es mayor y dicha relación en la carne de los animales mencionados es muy superior a la recomendada.

10 Sin embargo, puesto que la ingesta de ácidos grasos  $\omega$ -3 puede aumentar el estrés oxidativo, es conveniente combinar la adición de estos ácidos grasos a alimentos con la adición simultánea de antioxidantes tales como el extracto supercrítico de romero o el alfa-tocoferol. Dichos antioxidantes, tal como se ha mencionado anteriormente, son conocidos en el estado de la técnica, si bien no era conocida hasta ahora su importante acción sinérgica al combinarlos con aceite de salmón enriquecido en EPA y DHA.

15 El extracto supercrítico de romero, además de contribuir a reducir el estrés oxidativo provocado por los ácidos grasos insaturados, tiene potenciales efectos preventivos de enfermedades muy graves, además de ser un excelente conservante alimentario natural. Para los fines de esta invención puede usarse el extracto supercrítico de romero comercializado por Flavex (Austria), por ejemplo, o bien el preparado mediante extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico a presiones comprendidas entre 150 y 250 bares y temperaturas comprendidas entre 40 y 70°C.

20 Por otro lado, el alfa-tocoferol presenta importantes ventajas como antioxidante, tal y como se ha mencionado. Para los fines de la invención se puede emplear el alfa-tocoferol comercializado por Roche, por ejemplo.

25 La interacción sinérgica de los ácidos grasos poliinsaturados del aceite de salmón enriquecido, el alfa-tocoferol y el extracto supercrítico de romero, permite lograr una relación  $\omega$ -3 /  $\omega$ -6 inferior a 5 y mantenerla durante la elaboración, conservación y preparación culinaria del producto alimenticio al que se añade la mezcla oleosa. Dicha acción sinérgica se traduce, además, en el mantenimiento de la actividad antioxidante del alfa-tocoferol y del extracto supercrítico de romero, así como en el mantenimiento tanto del contenido de alfa-tocoferol como del contenido de diterpenos fenólicos del extracto supercrítico de romero en el producto alimenticio al que se añade la mezcla oleosa de la invención.

En una realización particular de la invención, la mezcla oleosa comprende:

- 30 - 70-99,9% de aceite de salmón enriquecido con entre el 10 y el 40% en EPA y DHA,  
 - 0,001-1% de alfa-tocoferol, y  
 - 0,1-5% de extracto supercrítico de romero,

siendo dichos porcentajes en peso con respecto al peso total de mezcla oleosa

En una realización preferida, la mezcla oleosa comprende:

- 35 - 80-97% de aceite de salmón enriquecido con entre el 10 y el 40% en EPA y DHA,  
 - 0,001-0,1% de alfa-tocoferol, y  
 - 1-3% de extracto supercrítico de romero,

siendo dichos porcentajes en peso con respecto al peso total de mezcla oleosa.

En una realización aún más preferida, la mezcla oleosa comprende:

- 40 - 82% de aceite de salmón enriquecido con entre el 10 y el 40% en EPA y DHA,  
 - 0,08% de alfa-tocoferol, y  
 - 1,6% de extracto supercrítico de romero,

siendo dichos porcentajes en peso con respecto al peso total de mezcla oleosa.

45 En otra realización particular de la invención, la mezcla oleosa comprende, además, microalga *Dunaliella salina*. Dicha microalga, tal y como se ha comentado anteriormente, es una de las más empleadas en alimentación por lo que su toxicidad está bien evaluada y, por tanto, su empleo no supone riesgos para la salud. La microalga *Dunaliella salina* presenta un importante contenido en carotenoides que pueden potenciar la acción antioxidante del alfa-tocoferol y del extracto supercrítico de romero y que, además, tienen propiedades preventivas de enfermedades

específicas como algunas relacionadas con la visión. La acción sinérgica entre el alfa-tocoferol y el extracto supercrítico de romero permite mantener dicho contenido de carotenoides en el producto alimenticio al que se incorpora la mezcla oleosa de la invención.

5 Para la realización de la invención se puede usar la microalga *Dunaliella salina* comercializada por Nature Beta Technologies (NBT) Ltd. (Israel), por ejemplo.

En una realización preferida de la invención, la mezcla oleosa comprende un 0,1-20%, preferiblemente un 3-18% y, más preferiblemente, un 16% de microalga *Dunaliella salina*, siendo dichos porcentajes en peso con respecto al peso total de mezcla oleosa.

10 En otro aspecto, la invención proporciona un producto alimenticio enriquecido con una mezcla oleosa a base de ingredientes bioactivos naturales que comprende aceite de salmón enriquecido en EPA y DHA, alfa-tocoferol y extracto supercrítico de romero, tal y como se ha detallado previamente.

En una realización particular, dicho producto alimenticio está enriquecido con una mezcla oleosa a base de ingredientes bioactivos naturales que comprende aceite de salmón enriquecido en EPA y DHA, alfa-tocoferol y extracto supercrítico de romero y, además, microalga *Dunaliella salina*.

15 En una realización preferida de la invención, dicho producto alimenticio enriquecido comprende:

- 0,1-20% de aceite de salmón enriquecido en EPA y DHA entre el 10 y el 40%,
- 0,00001-1% de alfa-tocoferol,
- 0,001-5% de extracto supercrítico de romero y, opcionalmente,
- 0,01-5% de microalga *Dunaliella salina*,

20 siendo dichos porcentajes en peso respecto al peso total de producto alimenticio.

En una realización aún más preferida de la invención, dicho producto alimenticio enriquecido comprende:

- 1-10% de aceite de salmón enriquecido en EPA y DHA entre el 10 y el 40%,
- 0,001-0,5% de alfa-tocoferol,
- 0,01-3% de extracto supercrítico de romero y, opcionalmente,
- 25 - 0,1-3% de microalga *Dunaliella salina*,

siendo dichos porcentajes en peso respecto al peso total de producto alimenticio.

Asimismo, en una realización aún más preferida de la invención, dicho producto alimenticio enriquecido comprende:

- 5% de aceite de salmón enriquecido en EPA y DHA entre el 10 y el 40%,
- 0,005% de alfa-tocoferol,
- 30 - 0,1% de extracto supercrítico de romero y, opcionalmente,
- 1% de microalga *Dunaliella salina*,

siendo dichos porcentajes en peso respecto al peso total de producto alimenticio.

35 El aceite de salmón se enriquece con EPA y DHA en una proporción que va del 10 al 40% en peso respecto al peso total de aceite. En una realización preferida, el aceite de salmón está enriquecido en un 18% en EPA y un 12% en DHA en peso respecto al peso total de aceite.

Para llevar a cabo la invención se pueden emplear el aceite de salmón enriquecido con un 18% en EPA y un 12% en DHA comercializado por Productos Químicos de Murcia S.A., por ejemplo.

40 El producto alimenticio enriquecido de la invención presenta un contenido de ácidos grasos poliinsaturados con una relación de ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 inferior a 5, lo que supone importantes beneficios para la salud humana, tal y como se ha explicado previamente. Dicha relación, gracias a la interacción sinérgica de los ácidos grasos  $\omega$ -3, el alfa-tocoferol y el extracto supercrítico de romero, se mantiene a lo largo de los procesos de elaboración, conservación y posterior tratamiento culinario de los productos alimenticios así enriquecidos.

45 En una realización particular, el producto alimenticio enriquecido de la invención es un producto cárnico. Preferiblemente, el producto alimenticio enriquecido de la invención es un producto cárnico que se selecciona del grupo que comprende salchichas tipo frankfurt, jamón cocido, pechuga de pavo cocida, chorizo curado, salchichón

curado, lomo curado y jamón curado.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la preparación de dicho producto alimenticio enriquecido que comprende las etapas de:

- 5
- a) preparar una mezcla oleosa a base de ingredientes bioactivos naturales mezclando dichos ingredientes bioactivos naturales, y
  - b) incorporar la mezcla oleosa preparada en a) al producto alimenticio que se va a enriquecer.

En una realización particular de dicho procedimiento, los ingredientes bioactivos naturales se mezclan en una proporción de:

- 10
- 70-99,9% de aceite de salmón enriquecido con entre el 10 y el 40% en EPA y DHA,
  - 0,001-1% de alfa-tocoferol,
  - 0,1-5% de extracto supercrítico de romero y, opcionalmente,
  - 0,1-20% de microalga *Dunaliella salina*,

siendo dichos porcentajes en peso con respecto al peso total de mezcla oleosa.

15 En una realización preferida del procedimiento de la invención, los ingredientes bioactivos naturales se mezclan en una proporción de:

- 80-97% de aceite de salmón enriquecido con entre el 10 y el 40% en EPA y DHA,
- 0,001-0,1% de alfa-tocoferol,
- 1-3% de extracto supercrítico de romero y, opcionalmente,
- 3-18% de microalga *Dunaliella salina*,

20 siendo dichos porcentajes en peso con respecto al peso total de mezcla oleosa.

En una realización aún más preferida del procedimiento de la invención, los ingredientes bioactivos naturales se mezclan en una proporción de:

- 25
- 82% de aceite de salmón enriquecido con entre el 10 y el 40% en EPA y DHA,
  - 0,08% de alfa-tocoferol,
  - 1,6% de extracto supercrítico de romero y, opcionalmente,
  - 16% de microalga *Dunaliella salina*,

siendo dichos porcentajes en peso con respecto al peso total de mezcla oleosa.

30 Así pues, para la preparación de los productos alimenticios enriquecidos de la invención, se pesan las cantidades adecuadas de cada uno de los ingredientes funcionales y se mezclan posteriormente hasta obtener un producto oleoso y ligeramente coloreado.

En el caso de que el producto alimenticio que se va a enriquecer sea un producto cárnico como las salchichas de tipo frankfurt, la mezcla oleosa de ingredientes bioactivos se añade en la operación de mezcla y formación de la emulsión cárnica. A continuación se procede a embutir la emulsión, a la cocción de las salchichas, a su envasado a vacío, y a su conservación en refrigeración durante un periodo máximo que oscila entre 30 y 90 días.

35 Para el caso de jamón cocido enriquecido, la mezcla oleosa de ingredientes bioactivos se inyecta en las piezas crudas de jamón junto con la salmuera. A continuación se introducen las piezas en un bombo de masaje para conseguir la difusión interna de la mezcla de compuestos bioactivos de manera uniforme en el interior de la carne. Posteriormente, se procede a la cocción de las piezas, a su envasado a vacío, y a su conservación en refrigeración durante un periodo máximo que oscila entre 30 y 90 días.

40 Para la preparación de pechuga de pavo cocida enriquecida, la mezcla oleosa de ingredientes bioactivos se inyecta en las piezas crudas de pechuga junto con la salmuera. A continuación se introducen las piezas en un bombo de masaje para conseguir la difusión interna de la mezcla de compuestos bioactivos de manera uniforme en el interior de la carne. A continuación se procede a la cocción de las piezas, su envasado a vacío, conservación en refrigeración durante un periodo máximo que oscila entre 30 y 90 días.

45 Para la preparación de lomo curado enriquecido, la mezcla oleosa de ingredientes bioactivos se inyecta en las

piezas crudas de lomo. A continuación se procede a embutir la carne y al curado de la misma.

Para la preparación de jamón curado enriquecido, la mezcla oleosa de ingredientes bioactivos se extiende sobre la superficie de las piezas crudas de jamón junto con la sal. Las piezas se someten luego a prensado suave y a curado.

- 5 Para la preparación de chorizo curado enriquecido, la mezcla oleosa de ingredientes bioactivos se mezcla junto con la carne picada y las especias. A continuación se procede a embutir la mezcla y al curado de la misma.

Para la preparación de salchichón curado enriquecido, la mezcla oleosa de ingredientes bioactivos se mezcla junto con la carne picada y las especias. A continuación se procede a embutir la mezcla y al curado de la misma.

- 10 Así pues, resumiendo, gracias a la adición de la mezcla oleosa sinérgica de la invención, el producto alimenticio enriquecido presenta las siguientes ventajas:

1. Presenta una relación  $\omega$ -6 /  $\omega$ -3 inferior a 5, manteniendo dicho perfil de ácidos grasos a lo largo de los procesos de elaboración, así como durante su vida útil y en las operaciones de preparación culinaria del mismo tales como la fritura.
- 15 2. No presenta un incremento significativo de su índice de oxidación por el hecho de haberle incorporado PUFA, sino que éste se mantiene prácticamente inalterado durante su elaboración, conservación y preparación culinaria.
3. No presenta un descenso significativo de la actividad antioxidante de los productos antioxidantes añadidos durante su elaboración, conservación y preparación culinaria.
- 20 4. No presenta cambios significativos del contenido de alfa-tocoferol durante su elaboración, conservación y preparación culinaria.
5. No presenta cambios significativos del contenido de diterpenos fenólicos que aporta el extracto supercrítico de romero durante su elaboración, conservación y preparación culinaria.
6. No presenta alteraciones significativas de los carotenoides que aporta la microalga *Dunaliella salina* durante su elaboración, conservación y preparación culinaria.

- 25 A continuación se presentan dos ejemplos de productos alimenticios enriquecidos que cubren todas las operaciones posibles de procesado de productos cárnicos:

- Ejemplo 1. Salchichas tipo frankfurt, en las que se pone de manifiesto la consecución y mantenimiento de las propiedades mencionadas en un proceso con cocción, conservación durante 60 días en refrigeración y a vacío, y posterior fritura
- 30 • Ejemplo 2. Chorizo ibérico curado, en el que se pone de manifiesto la consecución y mantenimiento de las propiedades mencionadas en un proceso con 50 días de curado.

Dichos ejemplos se exponen para una mejor comprensión de la invención. En ningún caso deben considerarse una limitación del alcance de la misma.

### **Métodos**

- 35 1. Perfil de ácidos grasos

Extracción: se evaluaron diversos métodos para la extracción de la fracción lipídica presente en las muestras: a) hexano, b) hexano/metanol, y c) hexano/agua (5/1). Los métodos a) y b) dieron lugar a la aparición de interfases que hacían difícil la separación de la fase hexano. El método c) fue el único de los probados que permitió una correcta separación de la fase hexano, por lo que fue elegido para el resto de extracciones.

- 40 Protocolo de extracción de los lípidos: 5 gramos de muestra fueron triturados previamente con el fin de homogeneizar la muestra. Posteriormente, se tomó 1 g de cada muestra en un vial falcon de 50 ml de capacidad y se añadieron 5 ml de H<sub>2</sub>O mili-Q, y seguidamente 25 ml de hexano. Se agitó vigorosamente la muestra con un Ultra Turrax durante 1 minuto y se recogió la fase sobrenadante. En algunos casos se hizo necesaria una etapa de centrifugación para una completa separación de la fase acuosa y la fase hexano. Dicha centrifugación se llevó a
- 45 cabo a 3800 rpm durante 5 minutos. Con el fin de garantizar que la mayor parte de la grasa presente en la muestra hubiera sido extraída, se efectuó una segunda extracción con 25 ml de hexano. En cada extracto el hexano fue evaporado hasta peso constante en rota-vapor a 40°C, y el residuo obtenido se guardó en un vial en atmósfera de nitrógeno y protegido de la luz.

- 50 Protocolo de derivatización de los extractos: Se prepararon disoluciones de concentración 25 mg/ml (para las muestras sin aceite de salmón) y 50 mg/ml (para las muestras con aceite de salmón) de los extractos en

cloroformo/metanol 2/1 (v/v). Se metilaron 0,5 ml de dichas disoluciones con NaOH en metanol (0,1M), a 60°C durante 30 min. A continuación, la derivatización se detuvo con la adición de 0,2 ml de agua mQ. Posteriormente los ácidos grasos metil éster formados fueron extraídos dos veces con 1 ml de hexano. Con el fin de eliminar el agua residual en la fase hexano, las fracciones se secaron con sulfato sódico anhidro.

- 5 Método cromatográfico para el análisis lipídico: Los análisis fueron llevados a cabo en un cromatógrafo Perkin-Elmer autosystem XL, con una columna BTR-Carbowax, de dimensiones: L = 30 m; I.D.: 250 µm; espesor de fase: 0,25 µm. El método cromatográfico fue el siguiente:

Temperatura del inyector: 220°C

Programa de temperatura del horno: 100°C ---180°C (a 20°C/min) --- 220°C (a 15°C/min) (33 min)

- 10 Temperatura del detector FID: 230°C

Tiempo total de análisis: 40 min.

Presión He: 4 bares ( $4 \cdot 10^5$  Pa)

Presión Aire sintético: 4 bares ( $4 \cdot 10^5$  Pa)

Presión Hidrógeno: 2 bares ( $2 \cdot 10^5$  Pa)

- 15 Presión Cabeza de columna: 12 bares ( $12 \cdot 10^5$  Pa)

Flujo He: 1 ml/min.

Relación de separación: 20: 1

Volumen inyección: 1 µl

- 20 Los tiempos de retención de los distintos ácidos grasos metil ésteres fueron determinados inyectando una disolución de 20 mg/ml (en hexano) de PUFA N°1 Marine Source, Supelco (4-7033).

## 2. Índice de oxidación

- El método se basa en la cuantificación del malondialdehído (MDA) originado como compuesto final de la oxidación de lípidos. Para la medida de dicho compuesto se procedió a su extracción de la muestra mediante ácido tricloroacético y su posterior cuantificación por reacción colorimétrica con ácido tiobarbitúrico, que dio lugar a la formación de un aducto de color rosa, que presentaba un máximo de absorbancia a 531 nm. A continuación se detalla el método de cuantificación utilizado: se tomaron 10 g de muestra ( $\pm 0,005$  g) anotando su peso, se añadieron 20 ml de ácido tricloroacético al 10% y se homogeneizó la muestra durante 30 segundos a 20000 rpm. Posteriormente se centrifugó durante 30 minutos a 4000 rpm a 10°C. Una vez centrifugada, se filtró la muestra y se tomaron 2 ml del sobrenadante en un tubo de ensayo. A estos 2 ml de sobrenadante se le adicionaron otros 2 ml de una disolución de ácido tiobarbitúrico (TBA, 300 mg/100 ml), se mezclaron con un vórtex, se taparon con papel de aluminio y se mantuvieron los tubos durante 20 minutos en un baño de agua a ebullición. Posteriormente se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se midió el color formado a 531 nm. Con el fin de evaluar el color propio de la muestra se llevaron a cabo ensayos en blanco, de igual forma que con las muestras pero sustituyendo los 2 ml de TBA por 2 ml de agua.

- 35 3. Actividad antioxidante

- La extracción de los compuestos añadidos se llevó a cabo mediante la adición de etanol (20 ml de etanol por 10 g de muestra) y el filtrado obtenido tras la centrifugación se llevo a sequedad. El residuo seco obtenido en cada caso se disolvió en etanol a una concentración de 15 mg/ml. Se utilizó un total de 0,1 ml de esta disolución para medir la capacidad antioxidante de los diferentes compuestos mediante el método del blanqueamiento del  $\beta$ -caroteno, lo que dio lugar a una concentración del compuesto estudiado en el medio de reacción de 60 µg/ml. El método del blanqueamiento del  $\beta$ -caroteno mide la capacidad de una sustancia que posee un efecto potencialmente antioxidante para inhibir la oxidación del  $\beta$ -caroteno cuando se encuentra en un medio emulsionado con ácido linoleico en condiciones pro-oxidantes.

## 4. Análisis de tocoferoles

- 45 Preparación de las muestras

Para cuantificar el contenido de tocoferoles del aceite de salmón añadido a las muestras se inyectaron directamente 20 µl de aceite en HPLC. De cada muestra se tomaron 10 g y se mezclaron con 20 ml de etanol. Se homogeneizó en el ultraturrax por 1 min y se centrifugó. El sobrenadante se pasó por un filtro y se concentró en un rotavapor a sequedad. Después se añadieron 2 ml de etanol. Los concentrados fueron pasados por un filtro e inyectados en

HPLC para su análisis usando una columna de fase reversa (Nova-Pak C18 60A 4µm 3,9 x 150 mm, Waters) y fueron desarrolladas a un flujo de 1 ml/min siguiendo un método isocrático de una mezcla de 97% metanol en 1% ácido acético (v/v) durante 20 min. La detección de los picos se realizó con un detector de fotodiodos para identificar los picos por su tiempo de retención y su espectro según los estándares mencionados y se cuantificó a una longitud de onda máxima para la mayoría de los compuestos (295 nm).

Para la cuantificación de las áreas detectadas se realizaron curvas de calibrado usando patrones de tocoferoles para cuantificar los picos de correspondientes de las muestras.

#### 5. Antioxidantes del extracto de romero

Método de extracción: Se pesaron 10 gramos de cada una de las muestras y se les añadieron 20 ml de acetona. Después de la homogeneización durante 1 minuto en el ultraturrax, se mantuvieron en reposo durante 2 horas para favorecer la separación de las fases. Posteriormente se centrifugaron a 3500 r.p.m durante 30 minutos. El sobrenadante se filtró a través de papel de filtro y se evaporó posteriormente en el rotavapor.

Método cromatográfico: Los análisis se llevaron a cabo en un equipo de HPLC con una columna Nova Pack C<sub>18</sub> de 150 mm de longitud, 4,6 mm de diámetro interno y un tamaño de partícula de 3,5 µm. La fase móvil utilizada en la separación consistió en una mezcla de disolventes A (acetonitrilo con 1% de ácido acético) y B (agua con 1% de ácido acético). Se varió la composición de la fase móvil de acuerdo con un gradiente de 30 minutos, comenzando por un 50% de B durante 5 minutos, 30% de B a los 15 minutos y alcanzando 0% de B a los 30 min. El flujo se mantuvo durante toda la separación a 0,7 ml/min. La detección de los compuestos se realizó con un detector de haz de diodos en un rango de longitud de onda desde 200 hasta 450 nm. La ranura de detección se estableció en 4 nm y el intervalo de muestreo en 200 ms. La longitud de onda elegida para la detección de los compuestos fue de 230 nm. El equipo estaba equipado con un inyector de 20 µl de capacidad.

#### 6. Perfil de carotenoides

Extracción de carotenoides de las microalgas: Se prepararon extractos de 0,05 g/ml de *Spirulina* y *Dunaliella* en éter de petróleo: acetona (1:1) para comparar la concentración de carotenoides de ambas algas. Se preparó un extracto de 0,005 g/ml de *Dunaliella* (correspondiendo al 1% añadido a muestras) en metiléter de terc-butilo para cuantificar la pérdida de carotenoides que se produce en la extracción de carotenoides por hacerse una única extracción en las muestras. Se realizó una segunda extracción para corroborar los datos experimentales con los bibliográficos.

Extracción de carotenoides de las muestras De cada muestra se pesaron 5 g y se trituraron durante 1 min con pausas de 5 seg en una picadora domestica. Se tomaron 5 g del picadillo y se mezclaron con 10 ml de metiléter de terc-butilo. La mezcla se homogeneizó en un Ultraturrax durante 1 min y se dejó reposar hasta que las dos fases se separaron (en oscuridad). El sobrenadante (20 µl) fue inmediatamente inyectado en el HPLC para su análisis.

Análisis por HPLC: Las muestras y los patrones se inyectaron en un HPLC usando una columna de fase inversa (Microsorb C18, 250 x 4,6 mm de Varian) y fueron desarrolladas a un flujo de 1 ml/min siguiendo un gradiente donde se comenzó con 50% de mezcla B que se incrementó en 14 min hasta 100% B y se mantuvo hasta final del desarrollo a los 53 minutos. Las mezclas de disolventes empleados fueron: como mezcla A: diclorometano: metanol: acetonitrilo: agua (0:60:5:35) y como mezcla B: diclorometano: metanol: acetonitrilo: agua (25:28:42,5:4,5). La detección de los picos se realizó con un detector de fotodiodos para identificar los picos por su tiempo de retención y su espectro según los estándares mencionados y se cuantificaron a una longitud de onda máxima para la mayoría de los compuestos (450 nm). Para la cuantificación de las áreas detectadas se realizaron curvas de calibrado usando luteína para cuantificar los picos de luteína de las muestras. Los picos de β-caroteno y 9-cis-β-caroteno se cuantificaron con la recta obtenida de la curva de β-caroteno debido a la similitud de su espectro.

#### **Ejemplo 1. Salchichas tipo frankfurt.**

##### Preparación

Una vez obtenida la emulsión cárnica convencional para la fabricación de las salchichas tipo frankfurt, se añaden a dicha emulsión las siguientes cantidades de los ingredientes de la mezcla oleosa, por kg. de pasta cárnica:

- 50 gramos de aceite de salmón desodorizado y enriquecido en un 18% en EPA y un 12% en DHA
- 1 gramo de extracto supercrítico de romero
- 0,05 gramos de alfa-tocoferol
- 10 gramos de *Dunaliella salina*

La mezcla oleosa se añade a la pasta cárnica en una mezcladora con el fin de obtener una emulsión con una distribución homogénea de los ingredientes de la mezcla oleosa. Posteriormente se realiza el embutido y la cocción a 70°C durante 60 minutos. A continuación las salchichas se envasan a vacío y se mantienen en refrigeración a 5°C durante 90 días. La fritura se realiza a 180°C durante tres minutos.

## Resultados

En la siguiente Tabla 1.1. se presenta el perfil lipídico de las salchichas determinado tras las operaciones de procesado y diversos tiempos de conservación.

**Tabla 1.1. Porcentaje molar de ácidos grasos**

	Pasta Control	Pasta sin embutir	Salchicha cocida	Salchicha a 21 día de conservación	Salchicha a 60 días de conservación	Salchicha frita
<b>Mirístico (C14:0)</b>	1,4	3,0	3,0	2,1	2,1	2,9
<b>Palmítico (C16:0)</b>	25,0	12,0	23,9	23,7	22,9	23,5
<b>Palmitoleico (C16:1)</b>	2,3	4,4	4,1	4,0	3,9	4,2
<b>Esteárico (C18:0)</b>	12,4	10,7	11,4	11,9	11,3	11,0
<b>Oleico (C18:1)</b>	40,7	35,0	36,1	36,9	35,3	36,0
<b>Linoleico (C18:2) n-6</b>	14,7	12,3	12,5	12,4	12,1	12,6
<b>Linolénico (C18:3) n-3</b>	0,8	0,8	0,8	0,8	0,7	0,8
<b>Estearidónico (C18:4) n-3</b>	0,0	0,6	0,5	0,4	0,4	0,5
<b>C20:1</b>	0,6	0,8	0,7	0,9	0,7	0,7
<b>EPA (C20:5) n-3</b>	0,0	4,5	3,3	3,2	3,2	3,5
<b>DPA (C22:5) n-3</b>	0,0	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3
<b>DHA (C22:6) n-3</b>	0,0	2,6	1,5	1,5	2,0	2,0
<b>saturados</b>	38,8	36,7	38,3	37,6	36,2	37,4
<b>monoinsaturados</b>	43,7	40,2	41,0	41,8	40,0	41,0
<b>n-6</b>	14,7	12,3	12,5	12,4	12,1	12,6
<b>n-3</b>	0,8	8,9	6,3	6,2	6,6	7,1
<b>n-6/n-3</b>	17,9	1,4	2,0	2,0	1,8	1,8

5

De los datos de la Tabla 1.1. puede deducirse en primer lugar que con la adición de 50g/kg de aceite de salmón enriquecido en EPA y DHA se reduce la relación  $\omega$ -6 /  $\omega$ -3 desde 17,9 hasta un valor inferior a 2, que se mantiene durante todo el proceso de elaboración, conservación y preparación culinaria. Además, el perfil lipídico también se mantiene estable.

10 El mantenimiento de la actividad antioxidante de la mezcla oleosa durante el procesado y la conservación es imprescindible para que se consigan los fines pretendidos. Además, la actividad antioxidante contribuye al mantenimiento del perfil lipídico ya que los PUFA son oxidables.

En la Tabla 1.2. se muestran los datos relativos al índice de oxidación de las salchichas.

**Tabla 1.2. Índice de oxidación**

	Pasta Control	Pasta sin embutir	Salchicha cocida	Salchicha a 21 día de conservación	Salchicha a 60 días de conservación	Salchicha frita
mg MDA/kg	0,10	0,27	0,32	0,29	0,32	0,35

5 Aun con la adición de una cantidad apreciable de PUFA, el índice de oxidación se mantiene en valores bajos durante todo el procesado y la conservación. Este resultado es coincidente con otros presentados y confirma el mantenimiento del perfil lipídico de PUFA, y por tanto la relación  $\omega$ -3 /  $\omega$ -6, así como el de la actividad antioxidante de los integrantes de la mezcla oleosa.

En la Tabla 1.3. se presentan los resultados de la determinación de la actividad antioxidante de las salchichas.

**Tabla 1.3. Actividad antioxidante**

	Pasta Control	Pasta sin embutir	Salchicha cocida	Salchicha a 21 día de conservación	Salchicha a 60 días de conservación	Salchicha frita
Actividad antioxidante	19,23%	68,73%	57,48%	56,58%	51,80%	63,66%

10 La incorporación de la mezcla oleosa aumenta en un factor de 3,4 veces la actividad antioxidante determinada en las salchichas antes del proceso. Dicha actividad antioxidante se reduce ligeramente durante las operaciones de procesado y la conservación pero durante la vida útil se mantiene en un factor nunca inferior a 2,5 sobre el producto sin mezcla oleosa.

El aumento de la actividad antioxidante tras la fritura puede deberse al efecto de la adsorción del aceite usado (aceite de oliva virgen).

15 En la Tabla 1.4. se presentan los resultados de los análisis de alfa-tocoferol en las salchichas. La presencia de alfa-tocoferol en las salchichas al final del procesado y la conservación es un indicador más de la alta actividad antioxidante de la mezcla oleosa.

20 Efectivamente, en un experimento paralelo en el que solamente se añadió aceite de salmón más alfa-tocoferol a las salchichas, no se pudo ni detectar al alfa-tocoferol antes de la cocción, siendo la actividad antioxidante en ese punto de 32,92%, es decir, menos de la mitad de la obtenida cuando se añadió la mezcla oleosa completa. Esto constituye una demostración de la **sinergia entre el alfa-tocoferol y el extracto supercrítico de romero**.

**Tabla 1.4. Concentración de alfa-tocoferol**

	Pasta Control	Pasta sin embutir	Salchicha cocida	Salchicha a 21 día de conservación	Salchicha a 60 días de conservación	Salchicha frita
µg/g alfa-tocoferol	0,0	30,0	14,5	11,5	10,2	8,7

25 La presencia de componentes del extracto supercrítico de romero es un indicador de su permanencia en las salchichas a lo largo de todo el proceso. En la Tabla 1.5 se presentan los resultados del análisis de ácido carnósico el componente antioxidante más activo del extracto supercrítico de romero y por otro lado el más lábil.

**Tabla 1.5. Concentración de ácido carnósico**

	Pasta Control	Pasta sin embutir	Salchicha cocida	Salchicha a 21 día de conservación	Salchicha a 60 días de conservación	Salchicha frita
mg/10g ácido carnósico	0,0	224,9	198,5	167,6	141,9	140,2

Aunque se aprecia la disminución de la cantidad de ácido carnósico presente en las salchichas al avanzar el proceso y la conservación, la presencia de este compuesto en concentración apreciable al final del proceso, incluso después de la preparación culinaria, queda demostrada.

30 La Tabla 1.6. recoge los resultados de los análisis de carotenoides en las salchichas. Estos compuestos son

aportados por la microalga *Dunaliella salina*.

**Tabla 1.6. Concentración de carotenoides**

	Pasta Control	Pasta sin embutir	Salchicha cocida	Salchicha a 21 día de conservación	Salchicha a 60 días de conservación	Salchicha frita
mg/g luteína	0,001	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02
mg/g de betacaroteno	0,004	0,42	0,37	0,37	0,28	0,41

5 Aunque se observan algunas oscilaciones, se comprueba que los carotenoides se mantienen estables durante todo el proceso. El incremento en las últimas etapas puede deberse a la liberación de estos compuestos del interior de las células de la microalga.

Conclusión

La incorporación de la mezcla oleosa en las salchichas tipo frankfurt aporta una actividad antioxidante, un contenido en antioxidantes naturales y una relación  $\omega$ -6 /  $\omega$ -3 >5 que se mantienen durante el proceso, la conservación y la preparación culinaria.

## 10 **Ejemplo 2. Chorizo ibérico curado.**

Preparación

A los ingredientes tradicionales del chorizo ibérico tradicional, se añaden las siguientes cantidades de los ingredientes de la mezcla oleosa, por kg. de pasta cárnica:

- 50 gramos de aceite de salmón desodorizado y enriquecido en un 18% en EPA y un 12% en DHA
- 15 - 1 gramo de extracto supercrítico de romero
- 0,05 gramos de alfa-tocoferol
- 10 gramos de *Dunaliella salina*

A continuación se procede al amasado de la mezcla en una amasadora industrial a vacío, al embutido y al curado hasta 50 días.

## 20 Resultados

En la siguiente Tabla 2.1. se presenta el perfil lipídico del chorizo curado determinado tras las operaciones de procesado y diversos tiempos de conservación.

Tabla 2.1. Porcentaje molar de ácidos grasos determinado

	Pasta Control	Chorizo	Chorizo tras 25 días de curación	Chorizo tras 50 días de curación
<b>Mirístico (C14:0)</b>	1,3	3,9	3,0	2,2
<b>Palmítico (C16:0)</b>	27,5	25,2	26,5	26,5
<b>Palmitoleico (C16:1)</b>	2,6	5,6	4,8	4,5
<b>Esteárico (C18:0)</b>	12,7	10,8	11,7	12,0
<b>Oleico (C18:1)</b>	46,6	36,5	40,1	40,6
<b>Linoleico (C18:2) n-6</b>	6,1	5,1	5,2	6,2
<b>Linolénico (C18:3) n-3</b>	0,4	0,5	0,3	0,5
<b>Estearidónico (C18:4) n-3</b>	0,0	0,7	0,3	0,4
<b>C20:1</b>	0,7	0,8	0,8	0,8
<b>EPA (C20:5) n-3</b>	0,0	5,3	3,0	2,3
<b>DPA (C22:5) n-3</b>	0,0	0,4	0,3	0,3
<b>DHA (C22:6) n-3</b>	0,0	3,2	2,0	1,5
<b>saturados</b>	41,6	39,9	41,2	40,8
<b>monoinsaturados</b>	49,9	42,9	45,6	46,0
<b>n-6</b>	6,1	5,1	5,2	6,2
<b>n-3</b>	0,4	10,1	5,9	5,0
<b>n-6/n-3</b>	14,2	0,5	0,9	1,2

5 De los datos de la Tabla 2.1. puede deducirse en primer lugar que con la adición de 50g/kg de aceite de salmón enriquecido en EPA y DHA se reduce la relación  $\omega$ -6 /  $\omega$ -3 desde 14,2 hasta un valor próximo a 1, que se mantiene durante todo el proceso de elaboración, incluyendo un periodo de curación de 50 días.

En cuanto a las determinaciones de actividad antioxidante, alfa-tocoferol, ácido carnósico, carotenoides e índice de oxidación, los resultados son análogos a los presentados para las salchichas.

#### Conclusión

10 La incorporación de la mezcla oleosa en el chorizo ibérico curado aporta una actividad antioxidante, un contenido en antioxidantes naturales y una relación  $\omega$ -6 /  $\omega$ -3 >5 que se mantienen durante el proceso completo, incluido el curado durante 50 días.

**REIVINDICACIONES**

1. Una mezcla oleosa a base de ingredientes bioactivos naturales para usar en la preparación de un producto alimenticio enriquecido, caracterizada porque comprende aceite de salmón enriquecido en EPA y DHA, alfa-tocoferol y extracto supercrítico de romero.
- 5 2. Mezcla oleosa según la reivindicación 1, **caracterizada porque** comprende:
- 70-99,9% de aceite de salmón enriquecido con entre el 10 y el 40% de EPA y DHA,
  - 0,001-1% de alfa-tocoferol, y
  - 0,1-5% de extracto supercrítico de romero,
- los cuales corresponden a porcentajes en peso con respecto al peso total de mezcla oleosa.
- 10 3. Mezcla oleosa según la reivindicación 2, **caracterizada porque** comprende:
- 80-97% de aceite de salmón enriquecido con entre el 10 y el 40% de EPA y DHA,
  - 0,001-0,1% de alfa-tocoferol, y
  - 1-3% de extracto supercrítico de romero,
- los cuales corresponden a porcentajes en peso con respecto al peso total de mezcla oleosa.
- 15 4. Mezcla oleosa según la reivindicación 3, **caracterizada porque** comprende:
- 82% de aceite de salmón enriquecido con entre el 10 y el 40% de EPA y DHA,
  - 0,08% de alfa-tocoferol, y
  - 1,6% de extracto supercrítico de romero,
- los cuales corresponden a porcentajes en peso con respecto al peso total de mezcla oleosa.
- 20 5. La mezcla oleosa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada porque** comprende, además, la microalga *Dunaliella salina*.
6. La mezcla oleosa según la reivindicación 5, **caracterizada porque** comprende 0,1-20%, preferiblemente 3-18% y, más preferiblemente, un 16% de microalga *Dunaliella salina*, siendo dichos porcentajes en peso con respecto al peso total de mezcla oleosa.
- 25 7. Un producto alimenticio enriquecido con una mezcla oleosa a base de ingredientes bioactivos naturales que comprende aceite de salmón enriquecido en EPA y DHA, alfa-tocoferol y extracto supercrítico de romero.
8. Producto alimenticio enriquecido según la reivindicación 7, **caracterizado porque** la mezcla oleosa a base de ingredientes bioactivos naturales comprende, además, la microalga *Dunaliella salina*.
- 30 9. Producto alimenticio enriquecido según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, **caracterizado porque** comprende:
- 0,1-20% de aceite de salmón enriquecido con entre el 10 y el 40%, de EPA y DHA.
  - 0,00001-1% de alfa-tocoferol,
  - 0,001-5% de extracto supercrítico de romero y, opcionalmente,
  - 0,01-5% de microalga *Dunaliella salina*,
- 35 los cuales corresponden a porcentajes en peso respecto al peso total de producto alimenticio.
10. Producto alimenticio enriquecido según la reivindicación 9, **caracterizado porque** comprende:
- 1-10% de aceite de salmón enriquecido con entre el 10 y el 40%, de EPA y DHA.
  - 0,001-0,5% de alfa-tocoferol,
  - 0,01-3% de extracto supercrítico de romero y, opcionalmente,
  - 0,1-3% de microalga *Dunaliella salina*,
- 40

los cuales corresponden a porcentajes en peso respecto al peso total de producto alimenticio.

11. Producto alimenticio enriquecido según la reivindicación 10, **caracterizado porque** comprende:

- 5% de aceite de salmón enriquecido con entre el 10 y el 40% de EPA y DHA.,
- 0,005% de alfa-tocoferol,
- 5 - 0,1% de extracto supercrítico de romero y, opcionalmente,
- 1% de microalga *Dunaliella salina*,

los cuales corresponden a porcentajes en peso respecto al peso total de producto alimenticio.

12. Producto alimenticio según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, **caracterizado porque** presenta un contenido de ácidos grasos poliinsaturados con una relación de ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 inferior a 5.

10 13. Producto alimenticio enriquecido según la reivindicación 12, **caracterizado porque** es un producto cárnico.

14. Producto alimenticio enriquecido según la reivindicación 13, **caracterizado porque** el producto cárnico se selecciona del grupo que consistente en salchichas tipo frankfurt, jamón cocido, pechuga de pavo cocida, chorizo curado, salchichón curado, lomo curado y jamón curado.

15 15. Un procedimiento de la preparación de un producto alimenticio enriquecido según cualquiera de las reivindicaciones 7-14, **caracterizado porque** comprende las etapas de:

- a) preparar una mezcla oleosa a base de ingredientes bioactivos naturales mezclando dichos ingredientes bioactivos naturales, y
- b) incorporar la mezcla oleosa preparada en a) al producto alimenticio que se va a enriquecer.

20 16. Procedimiento según la reivindicación 15, **caracterizado porque** los ingredientes bioactivos naturales se combinan en una proporción de:

- 70-99,9% de aceite de salmón enriquecido con entre el 10 y el 40% de EPA y DHA,
- 0,001-1% de alfa-tocoferol,
- 0,1-5% de extracto supercrítico de romero y, opcionalmente,
- 0,1-20% de la microalga *Dunaliella salina*,

25 los cuales corresponden a porcentajes en peso con respecto al peso total de mezcla oleosa.

17. Procedimiento según la reivindicación 16, **caracterizado porque** los ingredientes bioactivos naturales se combinan en una proporción de:

- 80-97% de aceite de salmón enriquecido con entre el 10 y el 40% de EPA y DHA,
- 0,001-0,1% de alfa-tocoferol,
- 30 - 1-3% de extracto supercrítico de romero y, opcionalmente,
- 3-18% de microalga *Dunaliella salina*,

los cuales corresponden a porcentajes en peso con respecto al peso total de mezcla oleosa.

18. Procedimiento según la reivindicación 17, **caracterizado porque** los ingredientes bioactivos naturales se combinan en una proporción de:

- 82% de aceite de salmón enriquecido con entre el 10 y el 40% de EPA y DHA,
- 0,08% de alfa-tocoferol,
- 1,6% de extracto supercrítico de romero y, opcionalmente,
- 16% de microalga *Dunaliella salina*,

los cuales corresponden a porcentajes en peso con respecto al peso total de mezcla oleosa.