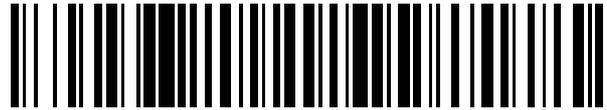


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 240**

21 Número de solicitud: 201730310

51 Int. Cl.:

A23B 4/20 (2006.01)

A23B 4/06 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

09.03.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

23.05.2017

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA
(100.0%)**

**Plaza Cronista Isidoro Valverde, s/n Ed. La
Milagrosa
30202 CARTAGENA (Murcia) ES**

72 Inventor/es:

**LOPEZ GOMEZ, Antonio y
ROS CHUMILLAS, Maria**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

54 Título: **Composición de hielo con actividad antimicrobiana, método de fabricación y aplicaciones de la misma.**

57 Resumen:

Composición de hielo con actividad antimicrobiana, método de fabricación y aplicaciones de la misma.

Esta invención se refiere a una composición de hielo con actividad antimicrobiana que comprende una solución de agua potable congelada y complejos de inclusión formados por aceites esenciales nanoencapsulados con ciclodextrinas, donde dichos complejos están atrapados en la estructura cristalina de la solución de agua potable congelada y donde los aceites esenciales se encuentran en una proporción de 30 a 300 mg/kg de agua. Asimismo se contempla el procedimiento para la fabricación de dicha composición de hielo que comprende: i) obtener complejos de inclusión formados por aceites esenciales nanoencapsulados en ciclodextrinas, en forma pulverulenta o en solución, ii) añadir los complejos de inclusión obtenidos en i) al agua de fabricación del hielo en una proporción de 30 a 300 mg de aceite esencial/kg de agua, para la obtención de una solución acuosa y iii) fabricar la composición de hielo a partir de la congelación de la solución acuosa obtenida en ii).

ES 2 613 240 A1

DESCRIPCIÓN

Composición de hielo con actividad antimicrobiana, método de fabricación y aplicaciones de la misma.

5

Campo de la invención

Esta invención está relacionada, en general, con el campo de la tecnología de conservación y preparación de alimentos refrigerados, tales como frutas y hortalizas frescas, pescados enteros o troceados, mariscos y otros productos del mar, carnes, platos preparados, y bebidas alcohólicas y no alcohólicas. Concretamente, esta invención se refiere a un nuevo tipo de hielo con actividad antimicrobiana que se caracteriza por incluir en su composición un agente natural nanoencapsulado a base de aceites esenciales formando un complejo de inclusión con ciclodextrinas. Asimismo se contempla el proceso de fabricación de la composición de hielo y sus aplicaciones como antimicrobiano para aumentar de forma significativa la seguridad alimentaria y la vida útil de los alimentos con los que entra en contacto para su conservación o preparación para su consumo.

15

Antecedentes de la invención

20

Es conocido que el hielo troceado o picado (o en escamas), o en forma de cubitos de distintas formas y tamaños, o incluso en forma de hielo líquido, se utiliza para enfriar y conservar alimentos de distinto tipo, como, por ejemplo, frutas y hortalizas (*Irtwange, S. V. "Keeping freshness in fresh-cut horticultural produce" (2006). Agricultural Engineering International: CIGR Journal; Kochhar, V. et al "Effect of Different Pre-Cooling Methods on the Quality and Shelf Life of Broccoli". (2015). Journal of Food Processing & Technology, 6, 424*), pescados (*Bensid, A. et al. "Effect of the icing with thyme, oregano and clove extracts on quality parameters of gutted and beheaded anchovy (*Engraulis encrasicolus*) during chilled storage" (2014) Food chemistry, 145, 681-686*), mariscos (*Wang, M. et al. "Preliminary mechanism of acidic electrolyzed water ice on improving the quality and safety of shrimp". (2015) Food chemistry, 176, 333-341*), y, en general, bebidas frías y platos preparados refrigerados o alimentos listos para consumir ("ready-to-eat"), como ensaladas o productos lácteos (*Nichols, G. et al "The microbiological quality of ice used to cool drinks*

30

and ready-to-eat food from retail and catering premises in the United Kingdom. (2000) *Journal of Food Protection*®, 63(1), 78-82). Pero este hielo en cubitos o picado se utiliza fundamentalmente por su acción de enfriamiento del producto y mantenimiento del mismo a una determinada temperatura, normalmente entre 0 °C y 4 °C.

5

Para estas aplicaciones del hielo, está establecido legalmente que el hielo debe ser fabricado a partir de agua potable, y debe tener una adecuada calidad microbiológica. No obstante, en distintos trabajos de investigación se ha puesto de manifiesto que el hielo para uso alimentario puede contener microorganismos coliformes, *Escherichia coli*, enterococos, y *Salmonella enteritidis* (*Nichols et al 2000; Falcão, J. P. et al. "Microbiological quality of ice used to refrigerate foods" (2002) Food Microbiology, 19(4), 269-276; Gerokomou, V., et al. "Physical, chemical and microbiological quality of ice used to cool drinks and foods in Greece and its public health implications. (2011) Anaerobe, 17(6), 351-353; Mako, S. L. et al "Microbiological quality of packaged ice from various sources in Georgia" 2014. Journal of Food Protection*®, 77(9), 1546-1553).

10

15

Por lo anterior, se han propuesto distintas formulaciones del hielo para ser utilizado en cubitos, o en trozos (hielo picado), con agentes antimicrobianos, como el hielo con peróxido de hidrógeno y ácido peroxycarboxílico (US2009/0291173 A1).

20

Además, estudios recientes han puesto de manifiesto que el hielo formulado con agentes antimicrobianos y antioxidantes puede tener también un efecto significativamente mayor de inhibición de procesos microbiológicos y bioquímicos involucrados en el deterioro del pescado conservado en hielo picado, si se compara con la simple conservación con hielo tradicional sin aditivos. Se ha demostrado el efecto beneficioso de los siguientes tipos de hielo: hielo líquido ozonizado (*Campos, C. A. et al. (2005). Effects of storage in ozonised slurry ice on the sensory and microbial quality of sardine (Sardina pilchardus). International Journal of Food Microbiology, 103(2), 121-130*), hielo de agua electrolizada (*Phuvasate, S. et al (2010). Effects of electrolyzed oxidizing water and ice treatments on reducing histamine-producing bacteria on fish skin and food contact surface. Food control, 21(3), 286-291; Wang et al 2015*), hielo con ácidos orgánicos (*Rey, M. S. et al. (2012). Effect of a natural organic acid-icing system on the microbiological quality of commercially relevant chilled fish species. LWT-Food Science and Technology, 46(1), 217-223; García-Soto, B. et al (2013). Extension*

25

30

of the shelf life of chilled hake (*Merluccius merluccius*) by a novel icing medium containing natural organic acids. *Food control*, 34(2), 356-363), hielo con dióxido de cloro (ClO₂) (Shin, J. H. et al (2004). Application of antimicrobial ice for reduction of foodborne pathogens (*Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes*) on the surface of fish". *Journal of applied microbiology*, 97(5), 916-922), hielo con soluciones de bromo/1,3-dibromo-5,5-dialquilhidantoína (WO2010051352), hielo con ácido peracético (US2009175956), hielo con partículas de zeolita impregnadas con plata, cobre, zinc, etc (US5950435), hielo con iones haluro (US6814984), hielo con ácidos orgánicos naturales, como ácido cítrico o ascórbico (Sanjuá Reya, M. et al "Effect of a natural organic acid-icing system on the microbiological quality of commercially relevant chilled fish species" *Food Science and Technology*. Volume 46, Issue 1, April 2012, 217-223), hielo con extracto de algas (WO2011058398) y hielo que contiene extractos de plantas, incluyendo aceites esenciales como romero, orégano o tomillo (Oral, N. et al (2008). Application of antimicrobial ice for extending shelf life of fish. *Journal of Food Protection*®, 71(1), 218-222; Quitral, V., et al (2009). Chemical changes during the chilled storage of Chilean jack mackerel (*Trachurus murphyi*): Effect of a plant-extract icing system. *LWT-Food Science and Technology*, 42(8), 1450-1454; Özyurt, G. et al (2012). Effect of the icing with rosemary extract on the oxidative stability and biogenic amine formation in sardine (*Sardinella aurita*) during chilled storage. *Food and Bioprocess Technology*, 5(7), 2777-2786; Bensid, A. et al. (2014). Effect of the icing with thyme, oregano and clove extracts on quality parameters of gutted and beheaded anchovy (*Engraulis encrasicolus*) during chilled storage. *Food chemistry*, 145, 681-686; Viji, P. et al (2016). Modified icing system containing mint leaf and citrus peel extracts: effects on quality changes and shelf life of Indian mackerel. *Indian J. Fish*, 63(2), 93-101). En estos trabajos de investigación sobre el uso de extractos de plantas y aceites esenciales se denomina al hielo con aditivos con efecto antimicrobiano como "hielo antimicrobiano", y se suele aplicar principalmente a la conservación de pescado y mariscos.

Lo que ocurre en la fabricación del hielo con agua con aceites esenciales es que, al no ser éstos solubles en agua, el hielo obtenido tiene una composición no uniforme, lo que puede hacer necesario el incremento de la dosis utilizada de aceites esenciales (en mg/kg de agua), lo que encarece este tipo de hielo, y puede hacer que su aplicación en la conservación de alimentos no sea efectiva por tener un hielo que en realidad no contiene una concentración suficiente de aceites esenciales.

En el estado de la técnica se han descrito composiciones de agentes microbianos nanoencapsulados utilizados en alimentación, lo que les da estabilidad, reduce su toxicidad y disminuye los costes (Blanco-Padilla, A. et al. "Food antimicrobial nanocarriers". *The Scientific World Journal*. Volume 2014 (2014), article ID 837215; Donsia, F. et al. "Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity". *Food Science and Technology*. Volumen 44, issue 9, november 2011, 1908-1914). En particular, se ha descrito el empleo de nano partículas de plata en hielo empleado en la conservación de pescado (SCG Kiruba Daniel et al. "Nano ice based on silver nanoparticles for fish preservation". *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies* 2016; 4(5): 162-167).

Un compuesto o complejo de inclusión es una forma única de complejo químico en el que una molécula (que se denomina huésped) está encerrada o incluida dentro de otra molécula (que se denomina anfitrión), o dentro de una agregación de moléculas (Marques (2010). "A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles". *Flavour and Fragrance Journal*, 25(5), 313-326). La estereoquímica y, posiblemente, la polaridad de las moléculas, tanto del anfitrión como del huésped, determinan si se puede producir este complejo de inclusión. En el caso de las ciclodextrinas, la principal causa de unión entre las ciclodextrinas y el huésped (considerando como tal a los distintos componentes de los aceites esenciales) es el ajuste geométrico entre las moléculas, por lo que la formación de complejos de inclusión con las ciclodextrinas se produce de forma estereoespecífica. De esta manera, es posible utilizar el anillo de ciclodextrinas para incluir o albergar una molécula parcialmente, bloqueando algunos sitios reactivos del huésped, y dejando otros expuestos al medio. Así, las ciclodextrinas pueden ser consideradas como agentes de nano-encapsulación, ya que la formación del complejo de inclusión es equivalente a la encapsulación molecular, porque las moléculas huésped quedan aisladas unas de otras y dispersadas a nivel molecular en una matriz de oligosacárido.

Los citados complejos de inclusión son muy estables cuando se han formado y secado. Pero cuando estos complejos de inclusión se disuelven en agua se produce la liberación controlada del huésped. Primero, se disuelve el complejo y después se libera el huésped hasta su límite de solubilidad en el agua, ocupando las moléculas de agua el lugar del huésped en la cavidad interior de las ciclodextrinas, hasta alcanzar un equilibrio entre el huésped liberado y el complejo (Santos, E. H. et al. (2015). *Characterization of carvacrol*

beta-cyclodextrin inclusion complexes as delivery systems for antibacterial and antioxidant applications. LWT-Food Science and Technology, 60(1), 583-592).

5 Se han descrito soluciones que comprenden complejos de inclusión, formados por aceites
esenciales, como isoeugenol o eugenol, nanoencapsulados en ciclodextrinas, para el
aturdido y sacrificio de peces (ES2576077). En estas aplicaciones, los complejos de
inclusión se mezclan en solución con agua dulce, agua de mar, hielo líquido o agua con
hielo picado, pero lo que se persigue es un efecto anestésico de los peces, no un efecto
10 antimicrobiano. Es por ello que las concentraciones utilizadas de aceites esenciales por kg
de agua son mucho menores.

Los autores de la presente invención, a la luz de las necesidades del estado de la técnica en
relación con: (1) los problemas derivados del uso de hielo que puede estar contaminado y
contener microbiología alterante y patógena; y (2) la necesidad de que el hielo tenga una
15 funcionalidad añadida antimicrobiana para conservar mejor el producto y alargar su vida útil,
pero sin que huela demasiado de forma que altere la calidad del producto, han desarrollado
una nueva composición de hielo que incluye aceites esenciales nanoencapsulados en
ciclodextrinas. Los complejos de inclusión así formados se formulan con el agua de
fabricación del hielo, quedando atrapados en su estructura cristalina una vez se congela,
20 dando lugar, de forma sorprendente, a un hielo que huele mucho menos que cuando éste
incluye los aceites esenciales sin nanoencapsular. El hielo antimicrobiano objeto de esta
invención disminuye la carga microbiana (tanto patógena como alterante) del producto con
el que entra en contacto, utilizando además menores dosis (mg/kg de hielo) de aceites
esenciales que cuando estos aceites se incluyen en el hielo sin nanoencapsular. Cuando
25 este nuevo hielo antimicrobiano se usa en conservación de alimentos por contacto directo
con este hielo, sorprendentemente se alarga la vida útil de esos alimentos, si se compara
con la conservación con hielo que no contiene agentes antimicrobianos, o con hielo que
contiene aceites esenciales sin nanoencapsular en ciclodextrinas o con hielo mezclado
mediante espolvoreado con aceites esenciales nanoencapsulados.

30 La metodología de preparación de hielo antimicrobiano que describen los trabajos de
investigación y patentes citados anteriormente no incluye el uso de agentes antimicrobianos
naturales nanoencapsulados en ciclodextrinas (CD), lo cual, como se ha comentado

anteriormente, proporciona una funcionalidad añadida al hielo antimicrobiano, como es el aumento de la solubilidad de los aceites esenciales, potenciando su eficacia antimicrobiana en medio acuoso y permitiendo la liberación modulada en el tiempo de los vapores de aceites esenciales, con una demostrada acción antimicrobiana sobre las superficies expuestas al aire del producto que se quiere conservar. De esta manera, no sólo se tiene acción antimicrobiana mejorada en las zonas de contacto del hielo con el producto a conservar, sino que se extiende la acción antimicrobiana a toda la superficie del producto que entrará en contacto con los vapores de aceites esenciales que se desprenden a medida que las ciclodextrinas (que contienen los aceites esenciales) quedan expuestas al aire con una humedad relativa elevada, al fundirse el hielo que las contiene.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Evolución en el tiempo (días) del recuento de Pseudomonas (Log UFC/g) en pescado (doradas enteras) conservado en hielo en cajas de poliestireno y en cámara frigorífica a 2 °C, en función del tipo de hielo aplicado: (●) Hielo normal sin antimicrobiano (Control); (■) Hielo con aceites esenciales nanoencapsulados (los aceites esenciales son una combinación de Carvacrol, aceite esencial de Bergamota y aceite esencial de Pomelo) (CBP); (▲) Hielo con aceite esencial (orégano) nanoencapsulado.

Figura 2. Evolución en el tiempo (días) del recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas (Log UFC/g) en pescado (doradas enteras) conservado en hielo en cajas de poliestireno y en cámara frigorífica a 2 °C, en función del tipo de hielo aplicado: (●) Hielo normal sin antimicrobiano, Control; (■) Hielo con aceites esenciales nanoencapsulados (CBP); (▲) Hielo con aceite esencial (de orégano) nanoencapsulado.

Figura 3. Evolución en el tiempo (días) del recuento de Bacterias Psicrótróficas en pescado (doradas enteras) conservado en hielo en cajas de poliestireno y en cámara frigorífica a 2°C, en función del tipo de hielo aplicado: (●) Hielo normal sin antimicrobiano, Control; (■) Hielo con aceites esenciales nanoencapsulados (CBP); (▲) Hielo con aceite esencial (de orégano) nanoencapsulado.

Figura 4. Evolución en el tiempo (días) de la Capacidad de Retención de Agua del músculo

del pescado (doradas) conservado en hielo en cajas de poliestireno y en cámara frigorífica a 2°C, en función del tipo de hielo aplicado: (●) Hielo normal sin antimicrobiano, Control; (■) Hielo con aceites esenciales nanoencapsulados (CBP); (▲) Hielo con aceite esencial (de orégano) nanoencapsulado.

5

Figura 5. Evolución en el tiempo (días) del recuento (Log UFC/g) de Enterobacterias en doradas almacenadas con hielo normal sin antimicrobiano (●), hielo espolvoreado con complejo β -CD+CBP en una proporción de 50 mg/kg de hielo normal, expresando esta proporción en mg de los aceites esenciales correspondientes por kg de hielo; (▲), y hielo con actividad antimicrobiana, objeto de esta invención, con complejo β -CD+CBP en una proporción de 50 mg/kg de hielo, expresando esta proporción en mg de los aceites esenciales correspondientes por kg de hielo (■) durante 17 días de conservación a 4 °C.

10

Figura 6. Evolución del recuento (Log UFC/g) de microorganismos aerobios mesófilos totales (AMT) en doradas almacenadas con hielo normal sin antimicrobiano (●), hielo espolvoreado con complejo β -CD+CBP en una proporción de 50 mg/kg de hielo normal, expresando esta proporción en mg de los aceites esenciales correspondientes por kg de hielo; (▲), y hielo con actividad antimicrobiana, objeto de esta invención, con complejo β -CD+CBP en una proporción de 50 mg/kg de hielo, expresando esta proporción en mg de los aceites esenciales correspondientes por kg de hielo (■) durante 17 días de conservación a 4 °C.

15

20

Figura 7. Evolución del recuento (Log UFC/g) de microorganismos aerobios psicrófilos en doradas almacenadas con hielo normal sin antimicrobiano (●), hielo espolvoreado con complejo β -CD+CBP en una proporción de 50 mg/kg de hielo normal, expresando esta proporción en mg de los aceites esenciales correspondientes por kg de hielo; (▲), y hielo con actividad antimicrobiana, objeto de esta invención, con complejo β -CD+CBP en una proporción de 50 mg/kg de hielo, expresando esta proporción en mg de los aceites esenciales correspondientes por kg de hielo (■) durante 17 días de conservación a 4 °C.

25

30

Figura 8. Evolución de los recuentos (Log UFC/g) de Pseudomonas en doradas almacenadas con hielo normal sin antimicrobiano (●), hielo espolvoreado con complejo β -CD+CBP en una proporción de 50 mg/kg de hielo normal, expresando esta proporción en

mg de los aceites esenciales correspondientes por kg de hielo; (▲), y hielo con actividad antimicrobiana, objeto de esta invención, con complejo β -CD+CBP en una proporción de 50 mg/kg de hielo, expresando esta proporción en mg de los aceites esenciales correspondientes por kg de hielo (■) durante 17 días de conservación a 4 °C.

5

Descripción detallada de la invención

En respuesta a los problemas y necesidades surgidos en el estado de la técnica en relación con las composiciones de hielo con actividad antimicrobiana, los autores de la presente invención han desarrollado un nuevo tipo de hielo con actividad antimicrobiana que incluye aceites esenciales nanoencapsulados en ciclodextrinas, y un nuevo método de fabricación del mismo, para su aplicación en distintos sectores agroalimentarios, y en la formulación de alimentos y bebidas.

Así, en un aspecto principal de la invención se contempla una composición de hielo con actividad antimicrobiana (de aquí en adelante composición de la invención) caracterizada porque comprende:

- a) una solución de agua potable congelada y
- b) complejos de inclusión formados por aceites esenciales nanoencapsulados con ciclodextrinas,

donde los complejos de inclusión están atrapados en la estructura cristalina de la solución de agua potable congelada y donde los aceites esenciales se encuentran en una proporción de 30 a 300 mg/kg de agua, preferentemente de 50 a 250 mg/kg de agua, indicando esta proporción mg del aceite esencial correspondiente por kg de solución de agua potable congelada.

A efectos de la presente invención, el término “solución de agua potable congelada” es equivalente al término “hielo”, formado por la congelación del agua potable.

Por otra parte, el término “agua de fabricación del hielo” se refiere al agua potable, o solución de agua potable, antes de su congelación.

A medida que se funde, el hielo libera el agente antimicrobiano natural, tanto en el medio líquido como en forma de vapor cuando el hielo está en contacto con un alimento sólido, de forma que se consigue una descontaminación microbiana tanto de la superficie del alimento con el que entra en contacto el hielo o el vapor liberado, como del agua que se forma por fusión del hielo que puede entrar en contacto con el exudado procedente del propio alimento, o con la bebida que se quiere enfriar.

Los aceites esenciales (AEs) de la composición de la invención pueden ser aceites esenciales puros de origen vegetal, seleccionados de entre los que proceden de brotes o yemas, flores, hojas, tallos, ramas, semillas, frutos, raíces, o la madera o corteza, o una mezcla de los mismos.

Por ejemplo, pueden ser aceites esenciales de cítricos, de naranja, limón, mandarina, lima, pomelo, bergamota, citronela, o de orégano, romero, tomillo, hierba de limón, canela, albahaca, hierbabuena, eneldo, o de cualquier parte o fruto de planta leñosa o procedente de plantas herbáceas como, por ejemplo, árbol de té, clavo, hinojo, pimienta, entre otros muchos.

En realizaciones particulares de la composición de la invención también se puede utilizar uno de los componentes, principales o no, de estos aceites esenciales, seleccionados de entre los que son terpenos, o terpenoides, o constituyentes aromáticos o alifáticos, o una mezcla de los mismos, o una mezcla de los mismos con una mezcla de los citados AEs puros.

Es decir, se pueden utilizar mezclas de los aceites esenciales puros, con o sin la adición de uno o más de sus componentes mayoritarios o no (como por ejemplo timol, carvacrol, entre muchos otros). Estas mezclas son ideadas para cada aplicación porque se puede comprobar experimentalmente que, por ejemplo, para inactivar o inhibir el crecimiento de un determinado tipo de microorganismo (alterante de la calidad del producto o patógeno para el consumidor), se necesita un determinado aceite esencial o una combinación determinada de aceites esenciales, incluyendo, o no, uno o más de sus componentes principales (como, por ejemplo, timol, carvacrol, limoneno, cinamaldehído, entre otros).

En realizaciones particulares de la composición de la invención, los tipos de ciclodextrinas empleados para la nanoencapsulación de los aceites esenciales y formación de los complejos de inclusión, se seleccionan de entre alfa-ciclodextrinas, beta-ciclodextrinas y gamma-ciclodextrinas (α -CD, β -CD, y γ -CD, respectivamente), o una mezcla de ellas en cualquier proporción. Estas ciclodextrinas tienen las características que se muestran a continuación en la Tabla 1:

Tabla 1. Características de las α -CD, β -CD, y γ -CD empleadas en la composición de la invención.

Característica	α -CD	β -CD	γ -CD
Número de unidades de glucosa	6	7	8
Peso molecular (Da)	972	1135	1297
Número de moléculas de agua en la cavidad	6	11	17
Solubilidad en agua a 25°C (%w/v)	14.5	1.85	23.2
Vida media en 1 M HCl a 60°C (h)	6.2	5.4	3.0
Diámetro de la cavidad central (nm)	0.5-0.6	0.6-0.8	0.8-1.0
Diámetro exterior (nm)	1.4-1.5	1.5-1.6	1.7-1.8
Altura de la forma Toroidal (nm)	0.8	0.8	0.8

Como la cavidad interior de las ciclodextrinas es hidrófoba, estas moléculas son capaces de albergar moléculas hidrófobas más pequeñas (como las moléculas de los distintos componentes de los aceites esenciales) para formar complejos “anfitrión-huésped”, en los que la molécula huésped queda encapsulada por la ciclodextrina. De esta forma, moléculas insolubles en agua (como las de los componentes de los aceites esenciales) pueden llegar a ser completamente solubles mediante la formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas (Samperio et al “Enhancement of plant essential oils’ aqueous solubility and stability using alpha and beta cyclodextrin. 2010. Journal of agricultural and food chemistry, 58 (24), 12950-12956), sin que se produzca modificación química alguna en la molécula huésped, ya que no se origina ningún enlace covalente durante la interacción entre la ciclodextrina y la molécula insoluble en agua, tal como establecen los autores Martínez y Gómez (“Ciclodextrinas: complejos de inclusión con polímeros” (2007) Revista

Iberoamericana de Polímeros, 8, septiembre, 300-312). Pero, una vez formados estos complejos de inclusión (o complejos “anfitrión-huésped”), la presencia de agua puede desestabilizarlos y provocar su descomposición. Esto es lo que ocurre, por ejemplo, cuando estos complejos de inclusión se ponen en contacto con aire con una humedad relativa elevada, superior al 85%. En estas condiciones de humedad relativa superior al 85%, las moléculas de agua provocan que se liberen las moléculas de aceites esenciales que estaban encapsuladas en las ciclodextrinas.

En otro aspecto principal de la invención, se contempla el procedimiento de fabricación de este nuevo tipo de hielo antimicrobiano (composición de la invención), que comprende las siguientes etapas:

- i) nanoencapsulación de los aceites esenciales en ciclodextrinas para la obtención de complejos de inclusión en forma seca (como sólido pulverulento) o en forma húmeda (en solución),
- ii) adición de los complejos de inclusión obtenidos en i) al agua de fabricación del hielo en una proporción de 30 a 300 mg/kg de agua, preferentemente de 50 a 250 mg/kg de agua, para la obtención de una solución acuosa, indicando esta proporción mg del aceite esencial correspondiente por kg del agua de fabricación del hielo, y
- iii) fabricación de una composición de hielo a partir de la congelación de la solución acuosa obtenida en ii).

La nanoencapsulación o preparación del complejo de inclusión correspondiente (como sólido pulverulento o en solución), según la formulación indicada anteriormente, entre el aceite esencial o combinación de aceites esenciales (o uno de sus componentes, o una combinación de aceites esenciales con uno o más de sus componentes, tal como se ha indicado anteriormente) y las ciclodextrinas, se puede llevar a cabo mediante cualquiera de los métodos siguientes: método del amasado, método de co-precipitación (basado o no basado en solubilidad de fase), método de calentamiento en un envase o recipiente sellado, método de interacción gas (o vapor)-líquido, método de liofilización, método de atomización, o usando tecnología de fluidos supercríticos (tal como describe con detalle el artículo de Marques, 2010).

Previamente a la etapa iii), los aceites esenciales nanoencapsulados en i) se pueden disolver en una pequeña cantidad de agua, en una concentración mayor, para ser añadida posteriormente al agua de fabricación del hielo, pero para conseguir igualmente un hielo con un contenido final en aceites esenciales nanoencapsulados de 30 a 300 mg/kg de hielo, preferentemente de 50 a 250 mg/kg de hielo.

Por lo indicado anteriormente, para que el aceite esencial nanoencapsulado quede atrapado en el hielo (en su estructura cristalina) y no quede separado el aceite esencial de las ciclodextrinas dentro del hielo, es preciso que la etapa ii) de adición del complejo en forma pulverulenta, o en solución, al agua de fabricación del hielo se haga unos minutos antes de la etapa iii) de fabricación de la composición de hielo objeto de esta invención. Es decir, los complejos de inclusión se añaden al agua de fabricación del hielo antes de su congelación, en una proporción de 30 a 300 mg/kg de agua, preferentemente de 50 a 250 mg/kg de agua, expresando esta proporción en mg de los aceites esenciales correspondientes por kg de agua de fabricación del hielo.

La fabricación del hielo se hace, a partir de la solución acuosa obtenida en la etapa ii) que contiene aceites esenciales nanoencapsulados formando complejos de inclusión con ciclodextrinas, en máquinas de fabricación de hielo en escamas, que se forman mediante rascado de la superficie fría donde se acumula el hielo, en intercambiadores de calor de superficie rascada; o bien, la fabricación del hielo se hace, a partir de la solución acuosa obtenida en la etapa ii), en máquinas de fabricación de piezas de hielo (en forma de cubitos o con tamaño más grande) de forma cilíndrica, y que pueden ser piezas macizas o huecas; o bien, la fabricación del hielo se hace, a partir de la solución acuosa obtenida en ii), en máquinas de fabricación de piezas de hielo (en forma de cubitos o con tamaño más grande) con forma paralelepípedica; o bien, la fabricación del hielo se hace, a partir de la solución acuosa obtenida en ii), en máquinas de fabricación de hielo líquido (definido el hielo líquido como se establece en el artículo de *Kauffeld, M. et al et al. "Ice slurry applications". (2010) International Journal of Refrigeration, 33(8), 1491-1505*) de forma que los cristales de hielo tengan un tamaño microscópico, y donde el hielo se encuentra en una proporción comprendida entre el 10 y el 70% en peso del total del peso de la mezcla de agua y hielo.

Después de la etapa iii) de fabricación del hielo, con cualquiera de las formas indicadas

anteriormente (excepto para el caso de fabricación de hielo líquido), el hielo es picado o no para adaptar el tamaño de los trozos de hielo a las necesidades de cada aplicación, para conseguir una determinada lentitud o rapidez (según el caso) de fusión del hielo en contacto con el producto al que se le aplica, o para conseguir un efecto de mayor o menor rapidez de enfriamiento, o para impedir que el hielo pueda dañar al alimento donde se aplica.

La composición, la fabricación, y la forma de aplicación del hielo objeto de esta invención permite, sorprendentemente, que los aceites esenciales no se evaporen durante la fabricación y conservación del hielo a temperaturas de congelación (por debajo de -1°C), porque no se derrite el hielo ni se evaporan los aceites esenciales nanoencapsulados, por lo que mantienen su concentración en el hielo hasta que se aplica el mismo a la conservación o formulación de alimentos o bebidas, o a otros usos. Sin embargo, esto no ocurre cuando se añaden directamente aceites esenciales sin nanoencapsular al agua de fabricación del hielo, o cuando se añaden los aceites esenciales nanoencapsulados en forma de polvo por encima del hielo ya fabricado y troceado. Estos aceites esenciales tienen tendencia a evaporarse, incluso a temperaturas negativas, de modo que el hielo que se fabrica de esta manera huele de una forma más intensa que cuando se fabrica con aceites esenciales nanoencapsulados, como propone esta invención. Si el hielo huele de forma demasiado intensa puede ser rechazado por los usuarios del mismo. Este problema se resuelve con la fabricación y uso del hielo objeto de esta invención.

Cuando los alimentos son conservados en la composición de hielo antimicrobiano de la invención, se genera una humedad relativa alta en el aire en contacto con la superficie del hielo y del producto (normalmente, por encima del 80%), y tiene lugar la liberación paulatina de los vapores de aceites esenciales desde la superficie de los trozos de hielo (por descomposición de los complejos de inclusión formados entre los aceites esenciales y las ciclodextrinas que están dentro del hielo antimicrobiano objeto de esta invención). Estos aceites esenciales, liberados en fase vapor desde la superficie de la composición de hielo de la invención, ejercen su acción antimicrobiana sobre los microorganismos presentes principalmente en la superficie de los alimentos que se conservan en contacto con este tipo de hielo.

Los aceites esenciales liberados por el hielo tiene una acción antimicrobiana frente a

hongos, levaduras y bacterias, tanto alterantes de la calidad del producto como patógenos para los consumidores. De esta forma, esta nueva composición de hielo puede aplicarse como antimicrobiano para aumentar de forma significativa la seguridad alimentaria y la vida útil de los alimentos con los que entra en contacto para su conservación o preparación para su consumo.

5

Así, la composición de hielo de la presente invención se puede aplicar a la conservación de carnes, pescados enteros o troceados y otros productos del mar de tipo comestible (como mariscos, algas, etc), realizando la conservación del producto en contacto con este hielo, de manera que se usan proporciones en peso de producto:hielo de 1:0.1 a 1:5. Este hielo puede estar mezclado con agua en proporciones agua:hielo de 1:0.1 a 1:5. Con esta aplicación aumenta la seguridad alimentaria y vida útil de estos productos, por el uso de combinaciones de aceites esenciales nanoencapsulados con acción antimicrobiana frente a patógenos y frente a la microbiología alterante (mohos y bacterias principalmente).

10

15

Otra aplicación del hielo objeto de esta invención es en la conservación de frutas y hortalizas frescas, enteras o troceadas. El hielo con aceites esenciales nanoencapsulados, según se ha descrito anteriormente, se pone en contacto con este hielo, en proporciones en peso de producto:hielo de 1:0.01 a 1:5. Con esta aplicación aumenta la seguridad alimentaria y vida útil de estos productos, por el uso de combinaciones de aceites esenciales nanoencapsulados con acción antimicrobiana frente a patógenos y frente a la microbiología alterante (mohos y bacterias principalmente).

20

En otra de las aplicaciones se puede mejorar la conservación de platos preparados, o bebidas alcohólicas o no alcohólicas, poniendo en contacto directo estos productos con el hielo con aceites esenciales nanoencapsulados, según se ha descrito anteriormente, en unas proporciones en peso de producto:hielo de 1:0.01 a 1:5. Como se ha indicado anteriormente, con esta aplicación aumenta la seguridad alimentaria y vida útil de estos productos, por el uso de combinaciones de aceites esenciales nanoencapsulados con acción antimicrobiana frente a patógenos y frente a la microbiología alterante (mohos, bacterias o levaduras).

25

30

El hielo objeto de esta invención se puede aplicar también a la formulación de bebidas

alcohólicas o no alcohólicas en el momento de su consumo, introduciendo hielo en la bebida para su consumo, usando unas proporciones en peso de bebida:hielo de 1:0.01 a 1:5. De esta manera se mejora la seguridad alimentaria del producto, por adicionar hielo con características antimicrobianas frente a patógenos.

5

De la misma manera, el hielo objeto de esta invención se puede aplicar a la formulación de platos preparados, sustituyendo el hielo convencional por este hielo antimicrobiano en la presentación de estos productos para su consumo. Esto se hace incorporando el hielo con aceites esenciales nanoencapsulados en el plato preparado, usando unas proporciones en peso de producto:hielo de 1:0.01 a 1:2. De esta manera se mejora la seguridad alimentaria del producto, por adicionar hielo con características antimicrobianas frente a patógenos.

10

A continuación se detallan algunos ejemplos prácticos, no exclusivos, de realización de la composición de la invención, de su procedimiento de fabricación y de sus aplicaciones.

15

EJEMPLOS

Para los ejemplos siguientes, se preparó el complejo de inclusión de aceites esenciales con β -ciclodextrinas (β -CD), siguiendo el método del amasado indicado por Marques (2010). El complejo de inclusión se obtuvo incorporando la combinación de aceites esenciales a las β -CD según una relación equimolecular. Los aceites esenciales usados se indican en cada uno de los ejemplos que se describen a continuación.

20

Ejemplos de composición, fabricación y aplicación del hielo objeto de esta invención a la conservación de pescado entero (doradas).

25

Los aceites esenciales utilizados en estos ejemplos fueron: (i) una combinación denominada CBP, de Carvacrol, Bergamota y de Pomelo, en proporción en peso 3:1:1; y (ii) aceite esencial de orégano. Los aceites esenciales fueron adquiridos en la empresa Esencias Martínez Lozano, S.A (España). Las β -CD fueron suministradas por la empresa Roquette Frères (Lestrem, France).

30

Los aceites esenciales nanoencapsulados se añadieron al agua de fabricación de hielo en la

proporción de 50 mg de aceite esencial por kg de agua. Minutos después, el hielo antimicrobiano con los aceites esenciales nanoencapsulados fue fabricado en máquinas modelo MFN-56 de la marca Scotsman de fabricación de hielo triturado (de unos 15 mm), con una producción de 470 kg/24 h.

5

Para los ensayos de conservación de pescado con el hielo objeto de esta patente, se tomaron piezas enteras de pescado (dorada) con un peso de 650 ± 50 g, fresco recién capturado. El pescado se colocó en cajas de poliestireno con una cabida de 12 piezas de dorada por caja. El pescado se cubrió con hielo en una proporción en peso pescado:hielo de 3:1.

10

En el Ejemplo 1 se comparó la evolución (durante 19 días de conservación en cámara frigorífica a 2 °C) de la calidad y la vida útil (determinada por la evolución del recuento microbiano en el pescado) del pescado envasado en cajas de poliestireno con hielo normal (sin aditivos), con el pescado envasado de igual manera pero con hielo con actividad antimicrobiana objeto de esta patente. Se tomaron muestras de pescado, 4 piezas de pescado entero en cada muestra, en los días 0, 7, 13, 15 y 19. En estas piezas de pescado entero se determinaron distintos parámetros de calidad de tipo físico-químico y microbiológico y se llevó a cabo el análisis sensorial.

15

20

En el Ejemplo 2 se compararon los siguientes tratamientos de conservación (en cámara frigorífica a 4 °C):

- **Conservación control:** las doradas fueron conservadas con hielo picado normal.
- **Conservación 1:** las doradas fueron conservadas en hielo picado con actividad antimicrobiana (composición de la invención), que incluía una combinación de aceites esenciales encapsulados en β -ciclodextrinas (β -CD). Los antimicrobianos utilizados fueron carvacrol, bergamota y pomelo (CBP) en una proporción (3:1:1) encapsulados en β -CD (tipo Kleptose, con un 4% de humedad, suministradas por la firma Roquette) y con una concentración de 50 mg/kg de hielo.
- **Conservación 2:** las doradas fueron conservadas en hielo picado normal al que se le adicionó, de forma espolvoreada sobre el mismo, el complejo de inclusión en forma de polvo que constituye la combinación de aceites esenciales encapsulados

25

30

en β -CD utilizados en el tratamiento de Conservación 1 anterior. Es decir, el hielo utilizado no incluía en su interior este complejo de inclusión. El citado polvo se añadió, espolvoreándolo sobre el hielo normal, en la misma proporción de 50 mg/kg de hielo.

5

Para los análisis microbiológicos, se diluyeron 25 g de muestra con 225 mL de agua de peptona tamponada estéril (de Scharlau Chemie) en una bolsa Stomacher estéril (Modelo 400, bolsas 6141, Londres, Reino Unido) y se homogeneizó durante 1 minuto utilizando un masticador (Colwort Stomacher 400 Lab, Seward Medical, Londres, Reino Unido). Para llevar a cabo los recuentos microbianos se hicieron diluciones seriadas de cada suspensión en agua de peptona estéril. Alícuotas apropiadas (de 0,1 o 1 mL) se extendieron sobre placas de agar. Se utilizó agar PCA (Plate Count Agar, de Scharlau Chemie) para el recuento de bacterias aerobias mesófilas y psicrotóficas, incubando las placas durante 48 horas a 30 °C y 7 días a 4 °C, respectivamente. Las *Pseudomonas* sp. se determinaron en agar Cetrimide (de Scharlau Chemie) después de incubación a 37 °C, durante 48 h. Las bacterias ácido lácticas se contaron en agar MRS (Man Rogose Sharpe, de Scharlau Chemie), incubando a 31 °C durante 48 h. Las *Enterobacteriaceae* spp. se contaron en agar VRBD (Violet Red Bile Dextrose, de Scharlau Chemie), incubando a 37 °C durante 24 h. Todas las placas se sembraron por duplicado y los resultados se expresaron como el logaritmo del número de Unidades Formadoras de Colonias por gramo de muestra (log UFC/g).

10
15
20

Además de los recuentos microbianos, se determinó:

25

- el pH del músculo (en pH-metro Basic 20, de Crison),
- el Nitrógeno TrimetilAmina (denominado N-TMA, y expresando el resultado como mg de N/100 g de músculo de pescado), usando el Método AOAC del Ácido Pírico, y midiendo en espectrofotómetro a 410 nm. En primer lugar, se pesaron 10 g de cada muestra de pescado triturado sin piel. La muestra fue homogeneizada con 20 mL de ácido tricloroacético al 7,5% (Scharlau Chemie S.A. Barcelona, España). Posteriormente la mezcla se filtró. Se tomó 1 mL del filtrado y se transfirió a un tubo de ensayo Pyrex con tapón de rosca. Además de dicha alícuota se añadieron 4 mL de agua destilada, 1 mL de formaldehído 37-38% (Panreac Quimica SAU,

30

Barcelona), 10 mL de tolueno (Panreac Quimica SAU, Barcelona) y 3 mL de disolución de carbonato potásico (Panreac Quimica SAU, Barcelona). Toda la mezcla fue agitada vigorosamente. A continuación, se tomaron 5 mL de la fase de tolueno y se transfirieron a un tubo de ensayo con 0,3 g de sulfato sódico anhidro. Se cerró el tubo con el tapón de polietileno y se agitó suavemente durante unos minutos para deshidratar el tolueno. El contenido se decantó sobre otro tubo de ensayo seco y se añadieron 5 mL de la disolución de trabajo de ácido pícrico. Una vez realizado todo lo anterior, se midió la absorbancia de la muestra a 410 nm mediante un espectrofotómetro Zuzi modelo 4110RS y se calculó el nitrógeno trimetilamina (N-TMA) en 100 g de pescado con referencia a una curva patrón. El blanco contenía 5 mL de tolueno y 5 mL de ácido pícrico. Para la realización de la curva de calibrado se preparó una solución patrón de trimetilamina, 1 mg N-TMA/mL. La solución de trabajo de trimetilamina 0,01 mg NTMA/ mL consistió en la disolución de 1 mL de la solución patrón de trimetilamina 1 mg N-TMA/ mL en 100 mL con agua destilada. Se agregó 1 mL de HCl 1:3 antes de enrasar. Con esta solución final de trabajo, se adicionó la cantidad correspondiente de 0 mL, 1 mL, 2 mL y 3 mL respectivamente en 4 tubos con rosca, adicionándoles un volumen determinado de agua destilada.

- la Capacidad de Retención de Agua (CRA), según el Método descrito por Grau y Hamm (*“Eine einfache methode zur bestimmung der wasser bindung im muskes. Naturwissenschaften, 6, 29-30 (1953)”*) y expresando su resultado en porcentaje. Para la determinación de la capacidad de retención de agua del músculo de pescado, se pesaron 0,3 g de muestra de músculo previamente picado. La muestra se coloca en el centro del papel de filtro (Whatman nº 540), previamente pesado, entre dos placas Petri. A continuación, se depositó suavemente sobre la placa superior un peso de 1 kg y se dejó durante 10 minutos, pasados los cuales, se retiró el peso. Para conocer el porcentaje de agua libre de la muestra de músculo de dorada se realizaron los siguientes cálculos: % agua libre = $(P1 - P0 / P) * 100$; Donde: P1 = Peso final papel; P0 = Peso inicial de papel; P = Peso de la muestra. La capacidad de retención de agua (CRA) es calculada de la siguiente forma: CRA = 100 - % agua libre.
- La Textura, que se determinó mediante el Análisis del Perfil de Textura (APT), en un Texturómetro TA-XT plus (de Stable Micro Systems) equipado con una célula de carga de 5 kg. Las medidas se llevaban a cabo usando una sonda (P/50) cilíndrica

de 50 mm de diámetro. Los análisis se realizaban en muestras de filete de la musculatura dorsal que se cortaban con una forma de pequeños prismas rectangulares de 2 x 2 x 1.5 cm. Las medidas consistían en dos ciclos consecutivos de 50% de compresión con 5 s entre ciclos. La velocidad de avance de la sonda era de 50 mm/min. Los datos de Fuerza por Tiempo de cada test se utilizó para calcular los valores de los parámetros del análisis APT, tal como se describe en el trabajo de Bourne, M. C. et al. (*Computer assisted readout of data from texture profile analysis curves*). (1978) *Journal of Texture Studies*, 9(4), 481-494): dureza (en N, fuerza máxima del primer ciclo de compresión), gomosidad (en N, dureza multiplicado por cohesividad), adhesividad (en N/s, es el área negativa del primer ciclo completo de compresión que representa el trabajo necesario para despegar el émbolo de la superficie de la muestra), cohesividad (es la razón entre el área positiva durante la segunda compresión y la de la primera, excluyendo las áreas bajo la zona de descompresión de la muestra en cada ciclo), masticabilidad (en N/mm, es la cohesividad multiplicada por la elasticidad) y elasticidad (en mm, altura que recupera la muestra durante el tiempo que transcurre entre los dos ciclos de compresión). Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente.

- Evaluación sensorial. Los atributos sensoriales del pescado cocido fueron evaluados por un panel de cinco catadores experimentados en cada día de muestreo. Las muestras de pescado (25 g) se cocinaron individualmente en un horno de microondas a plena potencia (850 W) durante 2 minutos e inmediatamente se presentaron calientes a los catadores. Cada catador debía evaluar sensorialmente aproximadamente 20 g de muestra de pescado cocinado. La evaluación sensorial se llevó a cabo en sala de cata normalizada, en cabinas individuales con condiciones controladas de luz, temperatura y humedad. Se pidió a los catadores que valoraran olor, sabor y textura del pescado utilizando una escala hedónica descriptiva de 0 a 10. El análisis sensorial se realizó usando el método Quality Index Method (QIM) descrito por Cardenas-Bonilla et al. (*Development of Quality Index Method (QIM) scheme for fresh cod (Gadus morhua) fillets and application in shelf life study*). (2007) *Food Control*, 18 (4): 352-358. Falcão, J.P, Dias, A.M.) y Ozogul et al. (*Effects of laurel and myrtle extracts on the sensory, chemical and microbiological properties of vacuum-packed and refrigerated European eel (Anguilla anguilla) fillets* (2014). *Int. J. Food. Sci. Techno*, 49, 847-853) y ligeramente modificado por Giarratana et al.

("Activity of R(+) limonene on the maximum growth rate of fish spoilage organisms and related effects on shelf-life prolongation of fresh gilthead sea bream fillets.(2016). International Journal of Food Microbiology, 237, 109-113).

5 **Resultados del Ejemplo 1:**

Los resultados de los análisis microbianos en las muestras de pescado ponen de manifiesto el interés de conservar el pescado en la composición de hielo de la presente invención, si se compara con la conservación en hielo normal sin aditivos (hielo Control). Se puede
10 comprobar, en la **Figura 1**, que los recuentos de Pseudomonas (que es una microbiología indicadora del deterioro del pescado fresco) son menores (del orden de una unidad Log UFC/g) en el pescado conservado en el hielo con aceites esenciales nanoencapsulados (con la combinación CBP de aceites esenciales) y a los 19 días de conservación. Algo parecido ocurre cuando se analizan los recuentos de bacterias aerobias mesófilas (**Figura**
15 **2**), y los recuentos de bacterias psicrótróficas (**Figura 3**). Esto quiere decir que el pescado conserva durante más tiempo sus características de frescura, aumentando su vida útil entre un 15 y un 27 % (hasta 4 días más de vida útil, sobre 15 días de vida útil del pescado conservado en hielo normal o Control), cuando se conserva con la composición de hielo con actividad antimicrobiana de la presente invención, si se compara con la conservación del
20 pescado en hielo normal sin aditivos antimicrobianos.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre las distintas muestras de pescado en cuanto a las características de pH y N-TMA, hasta el día 15 de conservación. Tampoco se observaron diferencias significativas en cuanto al análisis sensorial entre las
25 distintas muestras, hasta el día 15 de muestreo. A partir de este día, la evaluación sensorial fue peor para el pescado conservado en hielo normal, en comparación con el pescado conservado en el hielo antimicrobiano de la invención. Estas diferencias de evaluación sensorial se mantuvieron hasta el día 19 de conservación. Esto quiere decir que la adición de aceites esenciales nanoencapsulados al hielo de conservación no provoca efectos
30 negativos o detectables en el análisis sensorial del pescado. Más bien todo lo contrario. A partir del día 15 de conservación, que se puede establecer como el final de vida útil del pescado conservado en el hielo Control (sin aditivos), se empiezan a ver diferencias significativas entre el pescado conservado en hielo normal y el conservado en hielo con

aceites esenciales nanoencapsulados, siendo bien aceptado el pescado conservado en el hielo con actividad antimicrobiana objeto de esta invención hasta el final de vida útil que se puede establecer en los 19 días. En este caso, la vida útil se aumenta en un 25%.

5 El N-TMA en el pescado conservado en hielo con aceites esenciales nanoencapsulados presenta valores (de 0,40) en el día 19 de conservación similares a los valores que presenta el pescado conservado en hielo normal (Control) en el día 13. Lo mismo ocurre para el parámetro CRA (**Figura 4**). Estos resultados de CRA vienen a confirmar lo que se indicaba anteriormente, en cuanto a que la conservación en la composición de hielo con actividad antimicrobiana de la presente invención, que incluye aceites esenciales nanoencapsulados, aumenta la vida útil de forma significativa en el pescado (en este caso, del orden del 25%).

Respecto de la textura, no se han observado diferencias significativas de textura entre las distintas muestras de pescado a lo largo del período de conservación estudiado.

15

Resultados del Ejemplo 2:

En cuanto al recuento de *Enterobacterias* (**Figura 5**), durante todo el periodo de conservación, se observa una menor población de *Enterobacterias* en las doradas almacenadas con el hielo con actividad antimicrobiana objeto de esta invención, con complejo β -CD+CBP en una proporción de 50 mg/kg de hielo antimicrobiano, con respecto a las doradas almacenadas con hielo normal, y el hielo normal con aplicación de espolvoreados de complejo β -CD+CBP en una proporción de 50 mg de CBP/kg de hielo normal. Se observa una reducción de medio ciclo logarítmico en las doradas almacenadas con hielo espolvoreado (Tratamiento de Conservación 2), y de un ciclo logarítmico en las doradas almacenadas (según el Tratamiento de Conservación 1) con la composición de hielo con actividad antimicrobiana de la presente invención, al final del periodo de almacenamiento.

30 Un recuento de microorganismos aerobios mesófilos totales (AMT) superior a 7 log UFC/g de pescado está considerado como límite máximo de aceptación del pescado conservado en hielo (*ICMSF, International Commission on Microbiological Specifications for Foods (2002). Microorganisms in Foods 7, Microbiological Testing in Foods Safety Management.*

Kluwer Academic/Plenum Publishers. Springer, Londres. 2002). Teniendo en cuenta este límite, en la **Figura 6** se observa que las doradas almacenadas con hielo picado (Tratamiento Control) presentan una vida útil menor que las doradas almacenadas con el hielo con actividad antimicrobiana objeto de esta invención (Tratamiento de Conservación 1), ya que a los 17 días de almacenamiento este límite es superado por las doradas almacenadas con hielo picado normal. En ese día 17 de conservación, se observa sorprendentemente que las doradas conservadas con la composición de hielo con actividad antimicrobiana de la presente invención (que incluye complejo β -CD+CBP a razón de 50 mg/kg de hielo) presentaban una carga de AMT menor (de casi un ciclo logarítmico) que las doradas conservadas en hielo normal, y menor (de medio ciclo logarítmico) que las doradas conservadas según las condiciones de Conservación 2 (con hielo normal al que se le ha espolvoreado por encima polvo del complejo β -CD+CBP a razón de 50 mg/kg de hielo, expresando esta proporción en mg de los aceites esenciales CBP por kg de hielo).

Al igual que ocurría con los anteriores microorganismos estudiados, existe un desarrollo mayor de microorganismos psicrófilos en doradas almacenadas con hielo normal y hielo espolvoreado con polvo del complejo β -CD+CBP (a razón de 50 mg CBP/kg de hielo), que en las doradas conservadas con hielo con actividad antimicrobiana objeto de esta invención (Conservación 1, que incluye complejo β -CD+CBP, a razón de 50 mg CBP/kg de hielo). Así, a los 17 días de conservación se observa una reducción de la carga de microorganismos psicrófilos en las doradas conservadas en este hielo con actividad antimicrobiana objeto de esta invención, de casi un ciclo logarítmico con respecto a las doradas almacenadas en hielo normal o hielo normal espolvoreado con polvo del complejo β -CD+CBP (**Figura 7**). A partir del quinto día de conservación se aprecia que el hielo espolvoreado con complejo β -CD+CBP sorprendentemente presenta mayores cargas de microorganismos psicrófilos que las doradas conservadas con el hielo con actividad antimicrobiana objeto de esta invención.

Al final del periodo de conservación (17 días), el recuento de *Pseudomonas* fue sorprendentemente menor para las doradas conservadas en hielo con actividad antimicrobiana objeto de esta invención (**Figura 8**). Las diferencias de frescura del pescado se observan sobre todo a partir del día 10 de conservación, ya que aumentan mucho más rápidamente los recuentos de *Pseudomonas* en el pescado conservado en hielo normal (con o sin espolvoreado de complejo β -CD+CBP) que en el pescado conservado en la

composición de hielo con actividad antimicrobiana de la presente invención. Sorprendentemente, el hielo normal al que se le aplica por encima un espolvoreado de polvos del complejo β -CD+CBP conserva el pescado igual o peor que el hielo normal sin aditivos. Se demuestra una vez más el interés de utilizar el hielo con actividad antimicrobiana objeto de la invención en la conservación de este alimento porque consigue un efecto antimicrobiano mucho más efectivo que el hielo normal al que se le espolvorean simplemente los polvos del complejo β -CD+CBP. El hecho de que los nanoencapsulados del complejo β -CD+CBP se incluyan dentro del hielo hace que se evaporen los aceites esenciales antimicrobianos de una forma más modulada y más eficaz, consiguiendo una más efectiva y sorprendente actividad antimicrobiana en el alimento que se conserva.

En lo que se refiere a los demás parámetros de calidad, sorprendentemente, se pone de manifiesto que cuando se conserva el pescado con el hielo con actividad antimicrobiana objeto de esta patente (tratamiento de Conservación 1), se consiguen:

- Menores niveles de N-TMA a lo largo de la conservación refrigerada, que son indicativos de mayor frescura del pescado, con diferencias significativas respecto de la Conservación 2 que utiliza hielo normal espolvoreado con polvo del complejo β -CD+CBP.
- Mejores valores de parámetros de textura (sobre todo en la dureza y la masticabilidad), a lo largo de la conservación refrigerada, que son indicativos de mayor frescura del pescado, con diferencias significativas respecto de la Conservación 2 que utiliza hielo normal espolvoreado con polvo del complejo β -CD+CBP.
- Mayores valores de capacidad de retención de agua (CRA), a lo largo de la conservación refrigerada, que son indicativos de mayor frescura del pescado, con diferencias significativas respecto de la Conservación 2 que utiliza hielo normal espolvoreado con polvo del complejo β -CD+CBP.
- Mejores puntuaciones en características sensoriales indicativas de frescura del pescado (evaluadas tanto en dorada fresca como cocinada). El uso de la composición de hielo con actividad antimicrobiana objeto de esta invención (que incluye aceites esenciales nanoencapsulados en β -CD) no afectó al olor de las doradas frescas y fueron las que mejor puntuación sensorial obtuvieron durante todo

el almacenamiento refrigerado a 4 °C.

5 Todo lo anterior se corresponde con la observación de que el hielo normal espolvoreado con polvo del complejo β -CD+CBP pierde sus propiedades antimicrobianas a los pocos días de conservación del pescado con hielo, siendo significativamente evidente en el análisis sensorial a partir de los 5 días de conservación. Sin embargo, sorprendentemente, al incluir el complejo en el interior del hielo (lo cual se consigue, tal como se ha indicado anteriormente, fabricando el hielo con agua que tiene disuelto el complejo de inclusión formado por aceites esenciales y β -CD) se consigue una modulación en el tiempo de la actividad antimicrobiana (porque se modula en el tiempo la liberación de los aceites esenciales que son volátiles), lo cual se refleja en una significativa apreciación de más frescura del pescado conservado con la composición de hielo antimicrobiano de la invención, si se compara con el pescado conservado con hielo normal (habiendo sido o no espolvoreado con complejo β -CD+CBP). Esto también se corresponde con la observación de que la composición de hielo de la presente invención, sorprendentemente, huele de forma menos intensa y su olor es mucho más suave y agradable, que el hielo picado normal mezclado mediante espolvoreado con polvo del complejo de inclusión β -CD+CBP.

20

25

30

REIVINDICACIONES

1.- Composición de hielo con actividad antimicrobiana caracterizada porque comprende:

5

- a) una solución de agua potable congelada y
- b) complejos de inclusión formados por aceites esenciales nanoencapsulados con ciclodextrinas,

10

donde los complejos de inclusión están atrapados en la estructura cristalina de la solución de agua potable congelada y donde los aceites esenciales se encuentran en una proporción de 30 a 300 mg/kg de agua, preferentemente de 50 a 250 mg/kg de agua.

2.- Composición de hielo según la reivindicación 1, que se caracteriza porque los aceites esenciales son aceites esenciales puros de origen vegetal, seleccionados de entre los que proceden de brotes, yemas, flores, hojas, tallos, ramas, semillas, frutos, raíces, la madera, la corteza o una mezcla de los mismos.

15

3.- Composición de hielo según la reivindicación 2, que se caracteriza porque los aceites esenciales son uno de los componentes de los aceites esenciales puros de origen vegetal, seleccionados de entre terpenos, terpenoides, constituyentes aromáticos o alifáticos, o una mezcla de los mismos, o una combinación de los mismos con una mezcla de los aceites esenciales puros.

20

4.- Composición de hielo según las reivindicaciones 1 a 3, que se caracteriza porque las ciclodextrinas utilizadas en la obtención de los citados complejos de inclusión con los aceites esenciales se seleccionan de entre α -ciclodextrinas, β -ciclodextrinas, γ -ciclodextrinas, o una mezcla de ellas.

25

5.- Procedimiento de fabricación de una composición de hielo con actividad antimicrobiana según las reivindicaciones 1 a 4, que comprende las etapas de:

30

- i) Obtención de complejos de inclusión formados por aceites esenciales

nanoencapsulados en ciclodextrinas, en forma pulverulenta, o en forma de solución,

- ii) Adición de los complejos de inclusión obtenidos en i) al agua de fabricación del hielo en una proporción de 30 a 300 mg de aceite esencial/kg de agua, preferentemente de 50 a 250 mg de aceite esencial/kg de agua, para la obtención de una solución acuosa y
- iii) Fabricación de la composición de hielo a partir de la congelación de la solución acuosa obtenida en ii).

5

10

6.- Procedimiento, según la reivindicación 5, caracterizado porque la obtención de los complejos de inclusión en la etapa i) se lleva a cabo mediante un método seleccionado entre método del amasado, método de co-precipitación, método de calentamiento en un recipiente sellado, método de interacción gas/vapor-líquido, método de liofilización, método de atomización y tecnología de fluidos supercríticos.

15

7. Procedimiento, según la reivindicación 5, donde el hielo fabricado en iii) es hielo líquido, en el que el hielo se encuentra en una proporción comprendida entre el 10 y el 70% en peso del total del peso de la mezcla de agua y hielo.

20

8. Procedimiento, según la reivindicación 5, donde el hielo fabricado en iii) es hielo en escamas o hielo en piezas, macizas o huecas.

9. Procedimiento según la reivindicación 8 donde el hielo fabricado en iii) se somete a una etapa iv) de picado.

25

10.- Empleo de una composición de hielo con actividad antimicrobiana, según las reivindicaciones 1-4 para la conservación de carnes, pescados, enteros o troceados, mariscos y otros productos comestibles del mar, donde la conservación de estos productos se lleva a cabo en contacto con el hielo en unas proporciones en peso de producto:hielo comprendidas entre 1:0.1 y 1:5.

30

11. Empleo de una composición de hielo con actividad antimicrobiana, según la reivindicación 10, donde el hielo está mezclado con agua en unas proporciones agua:hielo

comprendidas entre 1:0.1 y 1:5.

5 12.- Empleo de una composición de hielo con actividad antimicrobiana, según las reivindicaciones 1-4 para la conservación de frutas y hortalizas frescas, enteras o troceadas, donde la conservación de estos productos se lleva a cabo en contacto con el hielo, en unas proporciones en peso de producto:hielo comprendidas entre 1:0.01 y 1:5.

10 13.- Empleo de una composición de hielo con actividad antimicrobiana, según las reivindicaciones 1-4 para la conservación de platos preparados y bebidas alcohólicas o no alcohólicas, donde la conservación de estos productos se hace en contacto con el hielo, en unas proporciones en peso de producto:hielo comprendidas entre 1:0.01 y 1:5.

15 14.- Empleo de una composición de hielo con actividad antimicrobiana, según las reivindicaciones 1-4, para la formulación de bebidas alcohólicas o no alcohólicas en el momento de su consumo, donde la formulación de estos productos se hace introduciendo el hielo en la bebida en unas proporciones en peso de bebida:hielo comprendidas entre 1:0.01 y 1:5.

20 15.- Empleo de una composición de hielo con actividad antimicrobiana, según las reivindicaciones 1-4, para la formulación de platos preparados, donde la formulación de estos productos para su consumo se hace incorporando el hielo en el plato preparado usando unas proporciones en peso de producto:hielo comprendidas entre 1:0.01 y 1:2.

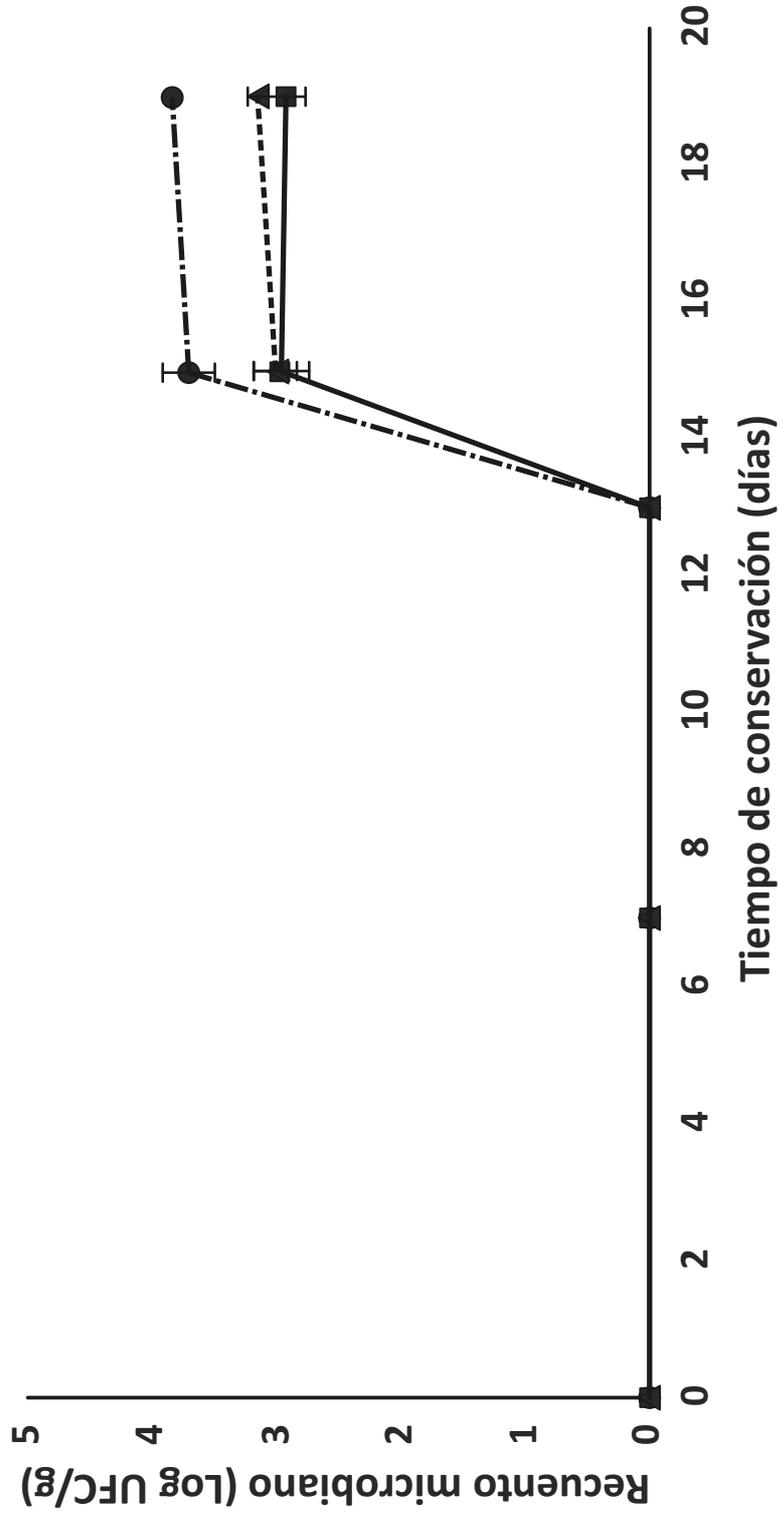


FIG. 1

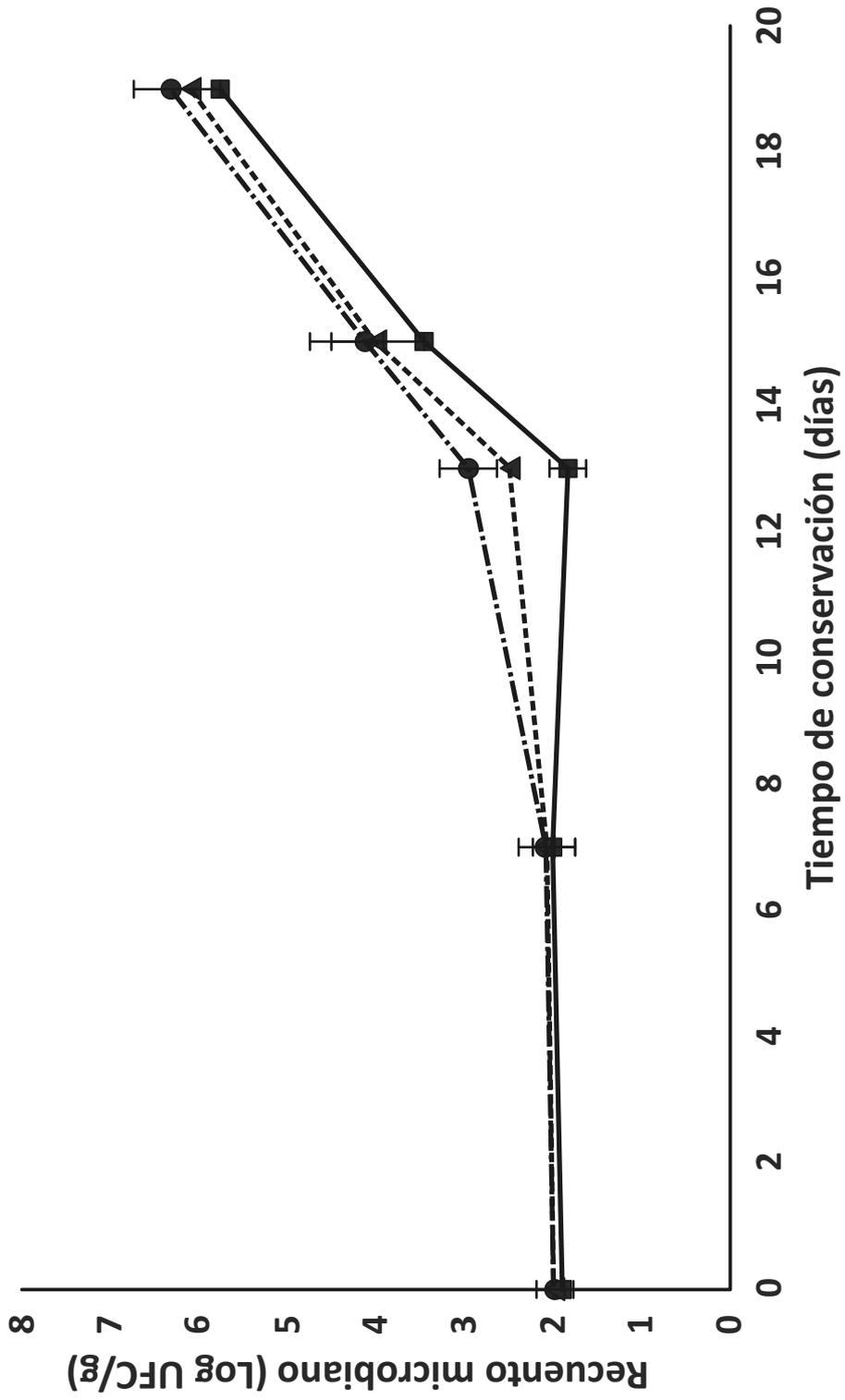


FIG. 2

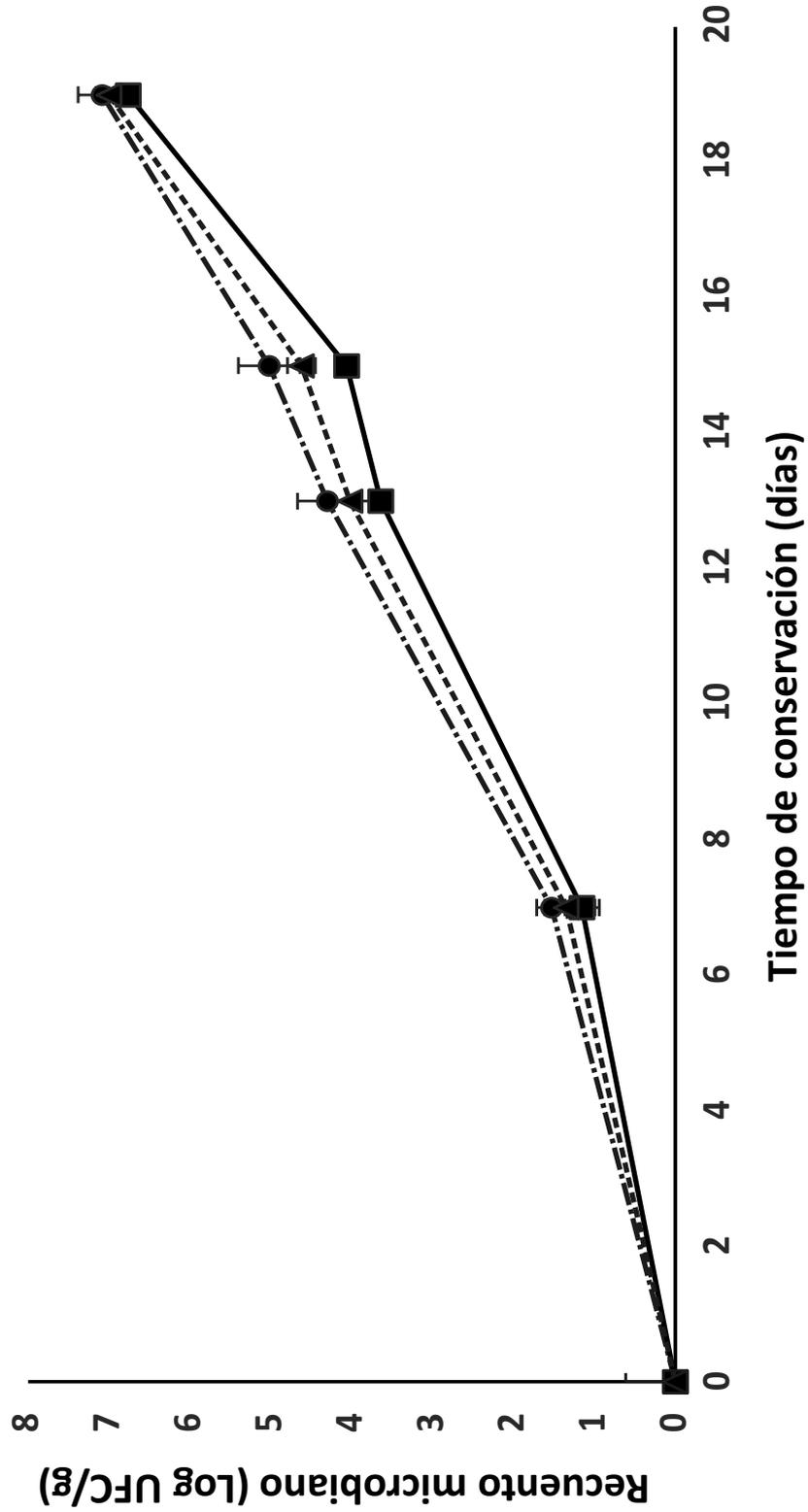


FIG. 3

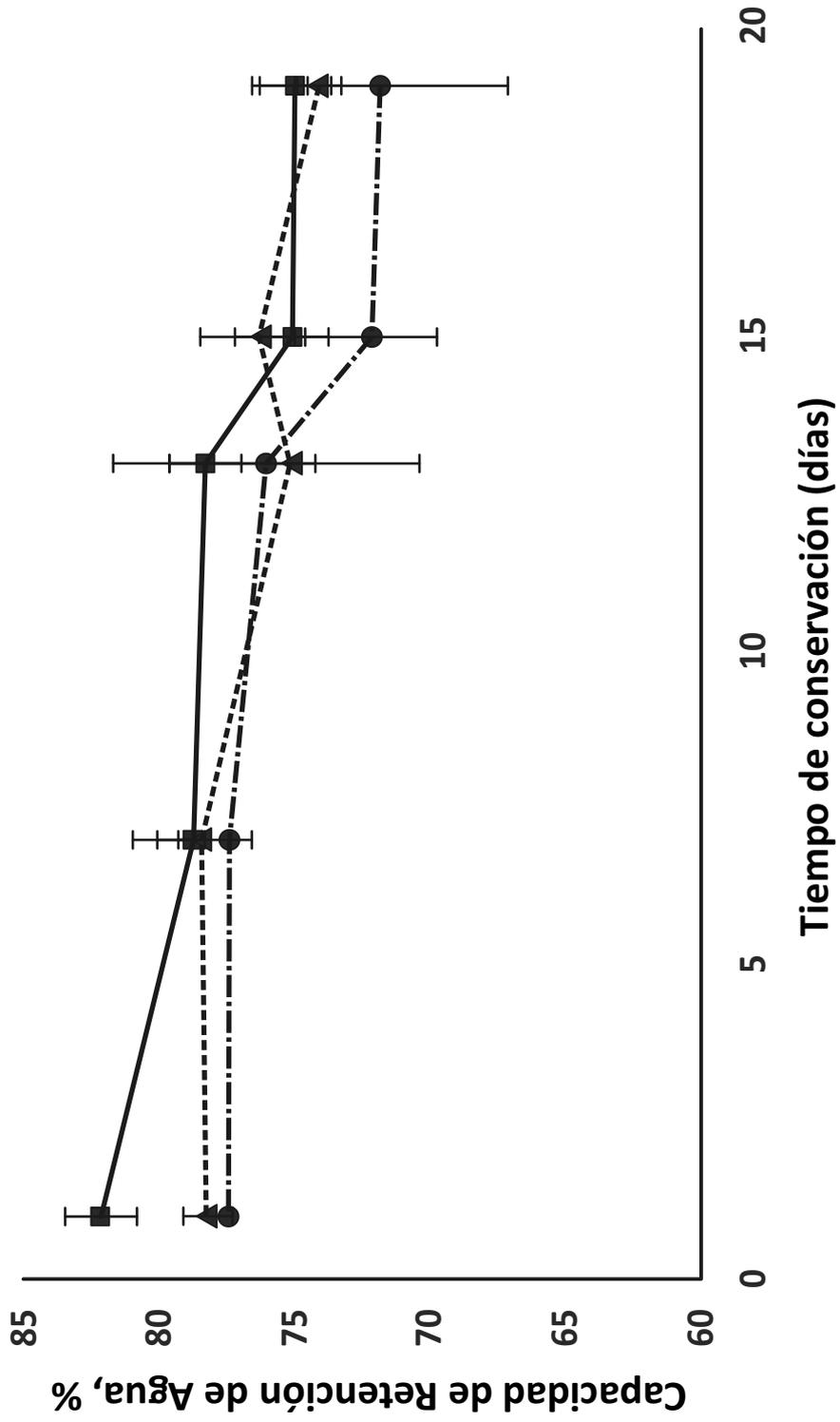


FIG. 4

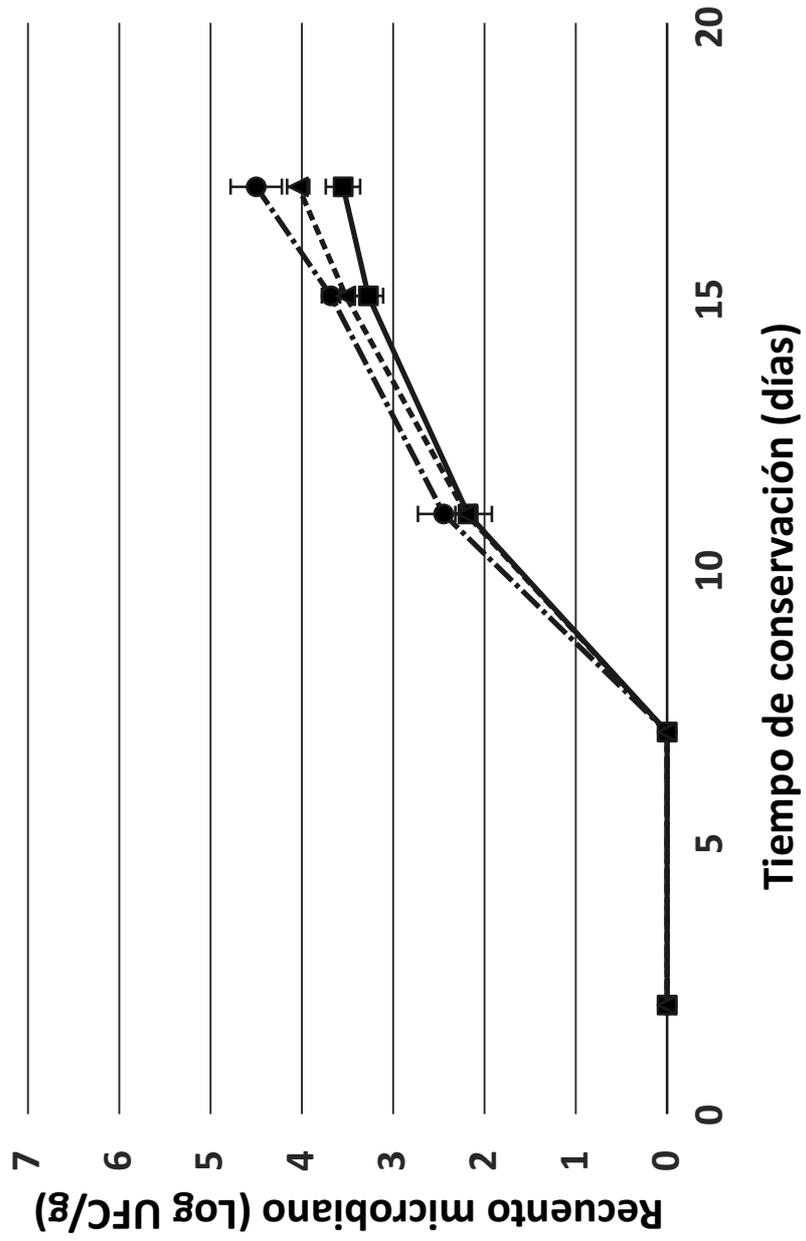


FIG. 5

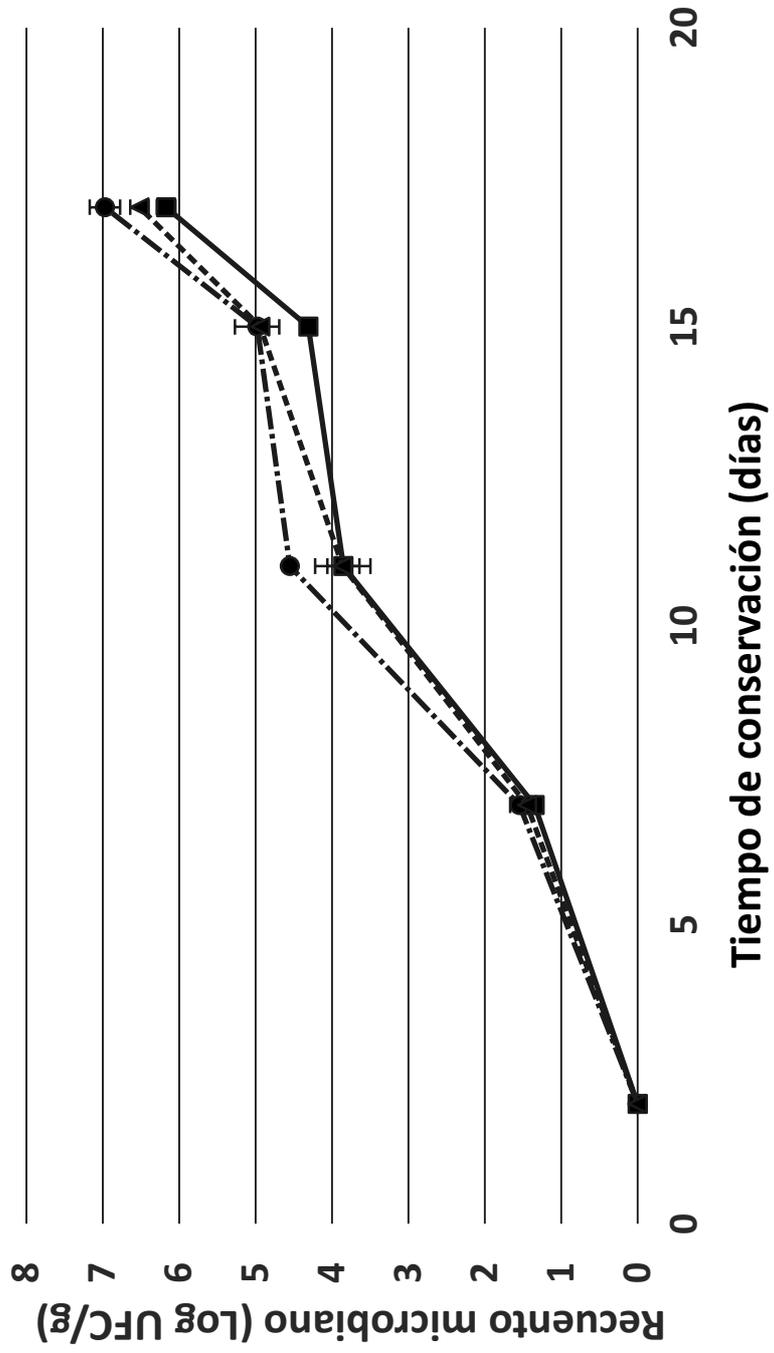


FIG. 6

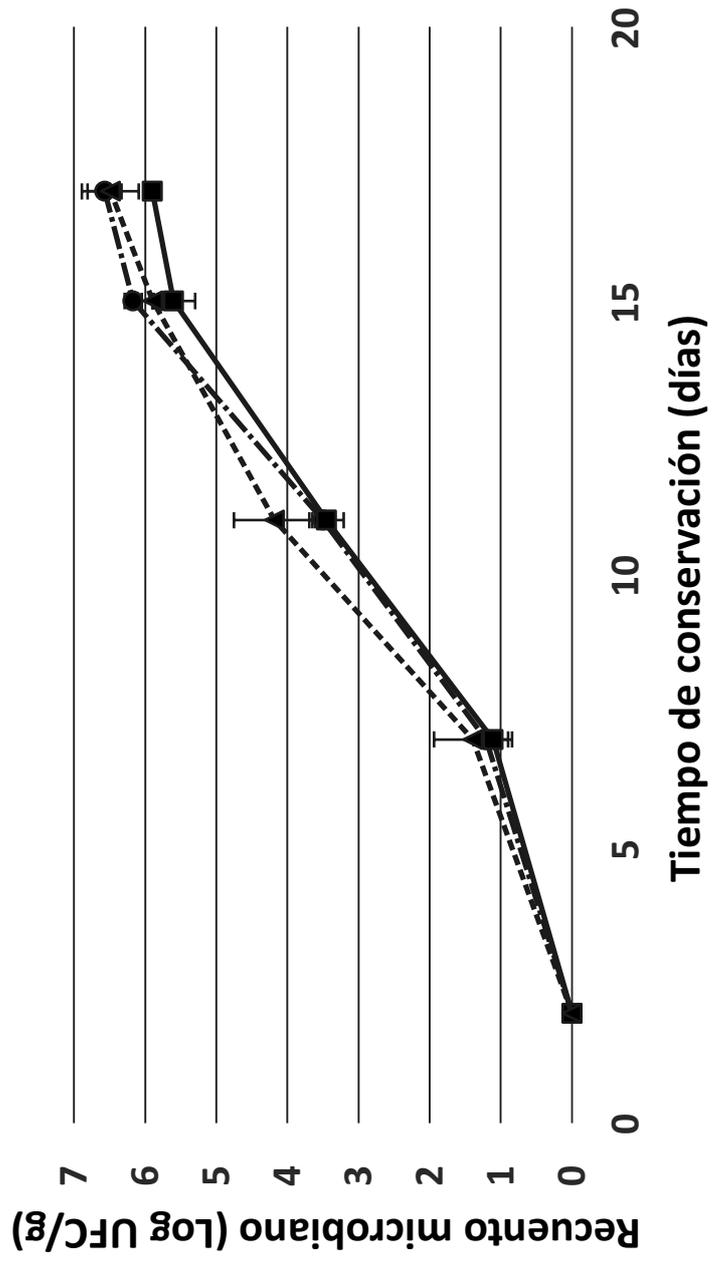


FIG. 7

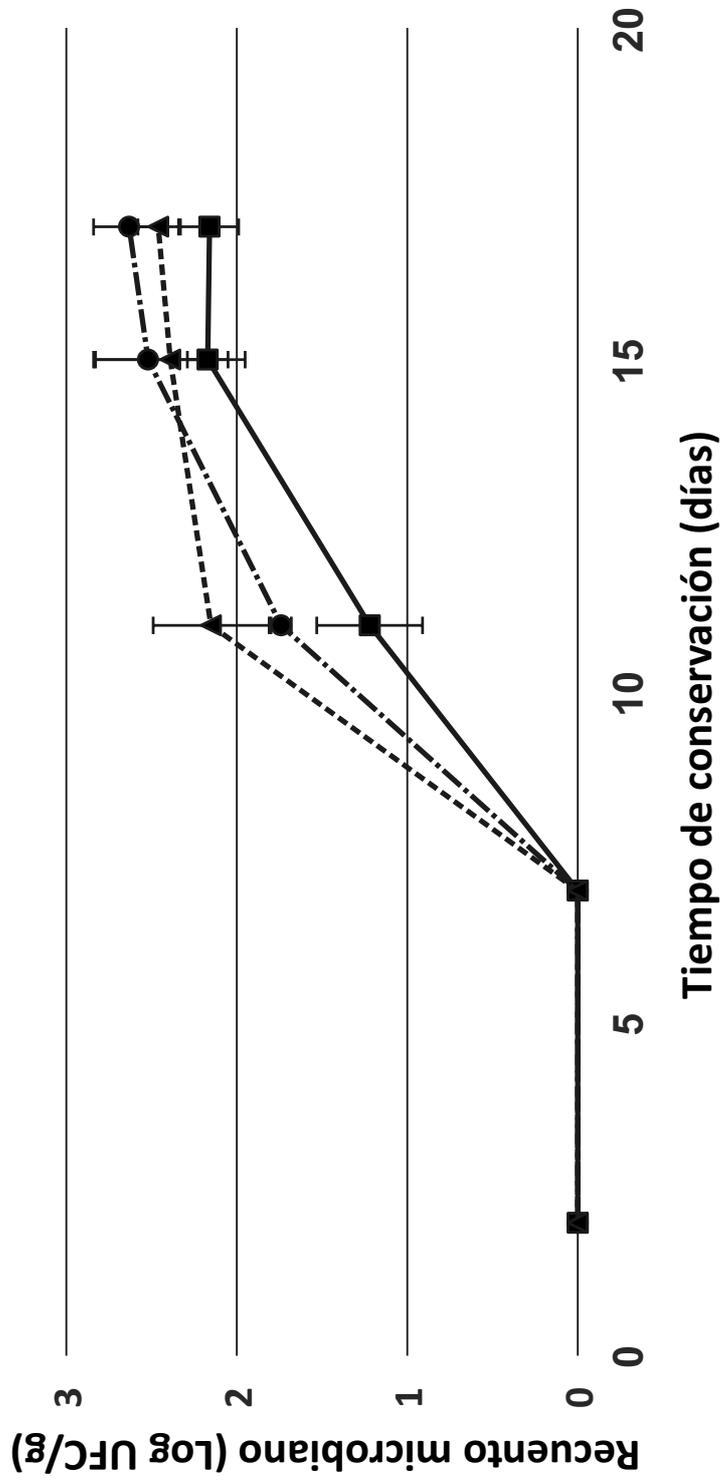


FIG. 8



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201730310

②② Fecha de presentación de la solicitud: 09.03.2017

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **A23B4/20** (2006.01)
A23B4/06 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ES 2576077 A1 (UNIV CARTAGENA POLITECNICA) 05/07/2016, Página 12, líneas 17-25; reivindicaciones 1-7.	1-9
Y		10-15
Y	Bensid Abdelkader et al. "Effect of the icing with thyme, oregano and clove extracts on quality parameters of gutted and beheaded anchovy (<i>Engraulis encrasicolus</i>) during chilled storage". Food Chemistry, 2014, Vol. 145, Páginas 681 - 686, ISSN 0308-8146, <DOI: doi:10.1016/j.foodchem.2013.08.106>. Resumen; apartados 2.2, 2.5. y 4.	10-15
Y	Hernandez-Sanchez Pilar et al. "Optimization of a method for preparing solid complexes of essential clove oil with -cyclodextrins". Journal of the Science of Food and Agriculture , 2016, Vol. 97, Páginas 420-426, ISSN 0022-5142(print) ISSN 1097-0010(electronic), <DOI: doi:10.1002/jsfa.7781>. Resumen; Experimental.	10-15

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 nº:

Fecha de realización del informe
08.05.2017

Examinador
N. Martín Laso

Página
1/5



- ②¹ N.º solicitud: 201730310
 ②² Fecha de presentación de la solicitud: 09.03.2017
 ③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: **A23B4/20** (2006.01)
A23B4/06 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	Hill L E et al. "Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications". Food Science and Technology, 2013, Vol. 51, Páginas 86 - 93, ISSN 0023-6438 (print), <DOI: doi:10.1016/j.lwt.2012.11.011>. Resumen; Conclusiones.	1-15
A	Lucera Annalisa et al. "Food applications of natural antimicrobial compounds". Frontiers in Microbiology, 2012, Vol. 3, Artículo 287, ISSN 1664-302X (Electronic), <DOI: doi:10.3389/fmicb.2012.00287 pubmed: 23060862>. Resumen; página 3, columna 2, párrafo 1.	1-15

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.º:

Fecha de realización del informe 08.05.2017	Examinador N. Martín Laso	Página 2/5
-------------------------------------------------------	-------------------------------------	----------------------

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A23B

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, DB-TXT, NPL, XPESP, BIOSIS, CAS.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 08.05.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-9	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-15	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ES 2576077 A1 (UNIV CARTAGENA POLITECNICA)	05.07.2016
D02	Bensid Abdelkader et al. "Effect of the icing with thyme, oregano and clove extracts on quality parameters of gutted and beheaded anchovy (<i>engraulis encrasicolus</i>) during chilled storage". Food Chemistry, 2014, Vol. 145, Páginas 681 – 686.	2014
D03	Hernandez-Sanchez Pilar et al. "Optimization of a method for preparing solid complexes of essential clove oil with – cyclodextrins". Journal of the Science of Food and Agriculture , 2016, Vol. 97, Páginas 420-426, ISSN 0022-5142(print) ISSN 1097-0010(electronic), <DOI: doi:10.1002/jsfa.7781>.	30.01.2017

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud se refiere a composiciones de hielo que comprenden complejos de inclusión de aceites esenciales encapsulados en ciclodextrinas, a un método de preparación de dichas composiciones y a su uso como antimicrobianos en la conservación de alimentos.

El documento D01 divulga composiciones de aceite esencial de clavo incluido en β -ciclodextrinas en hielo líquido. El aceite esencial se encuentra en una concentración de 20, 40 ó 60 mg/L de agua. El hielo en el que se incorpora el aceite es hielo líquido en el que el hielo se encuentra en una proporción comprendida entre el 10 y 70% respecto del total del peso de la mezcla de hielo y agua. Dicha composición se utiliza como anestésico de peces (página 12, líneas 17-25; reivindicaciones 1-7).

La invención definida en las reivindicaciones 1-9, referentes a la composición y a su método de preparación, se encuentra recogida en dicho documento D01, careciendo por tanto de novedad (Art. 6.1 LP 11/1986).

En relación a las reivindicaciones 10-15, referentes al uso de las composiciones definidas en la reivindicación 1 como antibacterianos, se reconoce novedad al no estar recogido dicho uso en el documento D01, pero no así actividad inventiva. Dado que es ampliamente conocido en el estado de la técnica la actividad antimicrobiana de aceites esenciales como los de clavo o orégano, tanto dispersados en hielo para la conservación de alimentos (ver documento D02, Resumen; apartados 2.2, 2.5. y 4) como formando complejos con ciclodextrinas para mejorar su solubilidad en agua (documento D03; Resumen; Experimental), un experto en la materia esperará que las composiciones definidas en la solicitud formadas por hielo en las que se incorpora los aceites formando complejos con ciclodextrinas posean la misma actividad antibacteriana.

Por lo tanto, la invención definida en las reivindicaciones 10-15 carece de actividad inventiva a la luz de lo divulgado en el documento D01 junto a lo recogido en el documento D02 ó D03 considerados por separado (Art. 8.1 LP 11/1986).

En conclusión, se considera que las reivindicaciones 1-15 no satisfacen los requisitos de patentabilidad establecidos en el art. 4.1 LP 11/1986.