

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 678 494**

51 Int. Cl.:

A23L 2/44 (2006.01)

A23L 3/3463 (2006.01)

A23L 2/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.06.2010 PCT/US2010/038750**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2010 WO10148045**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2010 E 10727613 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018 EP 2442678**

54 Título: **Sistema de conservante de bebidas que contiene complejo de pimaricina - ciclodextrina**

30 Prioridad:

19.06.2009 US 218484 P

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

13.08.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SMITH, RICHARD, T.

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 678 494 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

Sistema de conservante de bebidas que contiene complejo de pimaricina - ciclodextrina

5 Campo técnico

Esta invención se refiere a sistemas de conservante de bebidas y a productos de bebida que comprenden el sistema de conservante. En particular, esta invención se refiere a sistemas de conservante de bebidas que tienen formulaciones adecuadas para cumplir las exigencias del consumidor de ingredientes saludables y respetuosos con el medio ambiente.

Antecedentes

Muchos productos alimenticios y de bebidas incluyen conservantes químicos para prolongar la vida útil de almacenamiento del producto e inhibir el crecimiento de microorganismos que producen deterioro (por ejemplo, mohos, levaduras, bacterias). Sin embargo, algunos conservantes actualmente en uso se han caracterizado como, o bien, un perjuicio para la salud, una amenaza para el medio ambiente, o bien, como insuficientemente estables. Por tanto, existe la demanda en el mercado de productos alimenticios y de bebidas que no incluyan estos conservantes perjudiciales, y aún todavía presenten una vida útil de almacenamiento prolongada.

Por ejemplo, se usan comúnmente ácido benzoico y sus sales en productos de bebidas como conservantes. Sin embargo, en algunas formulaciones de bebidas que presentan vitamina C y un pH relativamente alto, una pequeña fracción de ácido benzoico y sus sales es susceptible de convertirse en benceno (cantidades de ppb). El calor y determinadas longitudes de onda de luz aumentan la velocidad de esta reacción, de modo que tiene que tenerse cuidado extra en la producción y el almacenamiento de tales productos de bebidas cuando incluye tanto benzoato como ácido ascórbico como ingredientes. La ingesta de benceno en el agua potable es un problema de salud pública, y la Organización Mundial de la Salud (OMS) y varios organismos gubernamentales dentro de los Estados Unidos y la Unión Europea han establecido límites superiores para el contenido en benceno en el agua potable de 10 ppb, 5 ppb y 1 ppb, respectivamente.

El ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) y sus sales son también un conservante de productos de bebidas común. El EDTA secuestra iones metálicos y puede tener un impacto sobre su participación en cualquiera de varias reacciones químicas. A concentraciones elevadas, EDTA puede servir para privar a las bacterias de los oligoelementos necesarios. A concentraciones relativamente bajas encontradas normalmente en la bebida, el EDTA facilita la actividad de al menos conservantes de ácido débil tales como ácido sórbico y benzoico. Sin embargo, el EDTA no es biodegradable, ni se elimina durante el tratamiento de aguas residuales convencional. El EDTA ha surgido como problema medioambiental predominantemente debido a su persistencia y propiedades fuertes de quelación de metales. El uso extendido de EDTA y su lenta eliminación en muchas condiciones ambientales ha conducido a su estatus como el compuesto antropogénico más abundante en muchas aguas superficiales europeas. Se notifican concentraciones de EDTA en ríos de Europa en el intervalo de 10-100 µg/l, y las concentraciones de EDTA en lagos están en el intervalo de 1-10 µg/l. Se han notificado concentraciones de EDTA en aguas subterráneas de los EE.UU. que reciben descargas de efluentes de aguas residuales en el intervalo de 1-72 µg/l, y se encontró que el EDTA era un trazador efectuado para el efluente, con concentraciones superiores de EDTA correspondientes a un mayor porcentaje de agua regeneradas en pozos de producción de agua potable.

Los polifosfatos son otro tipo de secuestrante empleado como conservante para productos de bebidas. Sin embargo, los polifosfatos no son estables en disolución acuosa y se degradan rápidamente a temperatura ambiental. La degradación de polifosfatos da como resultado problemas sensoriales insatisfactorios en el producto de bebida, tal como cambio en la acidez. Además, la vida útil de almacenamiento del producto de bebida puede verse comprometida a medida que la concentración de polifosfato se deteriora. Koontz *et al.* en J. Agric. Food Chem 2003, 51, páginas 7106-7110 (XP2608287) da a conocer la formación de complejos de inclusión de natamicina:ciclodextrina en disoluciones acuosas.

La solicitud de patente estadounidense 20070065547 da a conocer material antimicrobiano encapsulado, tal como natamicina, en zumo de naranja.

Por tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar nuevos sistemas de conservante para su uso en bebidas como sustitutos para al menos un conservante actualmente usado que tiene efectos perjudiciales sobre la salud y/o el medio ambiente, o falta de suficiente estabilidad. Un objeto adicional de la invención es proporcionar nuevos sistemas de conservante de bebidas con impacto sensorial mejorado. Un objeto adicional de la invención es proporcionar sistemas de conservante sin ácido benzoico y/o concentraciones reducidas de ácido sórbico. Algunos países tienen restricciones regulatorias sobre el uso de ácido sórbico en productos alimenticios y de bebidas en los que la concentración permitida es menor que la requerida para inhibir el crecimiento de microorganismos que producen deterioro.

Sumario

Según un aspecto de la invención, se proporciona un sistema de conservante de bebidas que comprende: un complejo de pimaricina-ciclodextrina; en el que el sistema de conservante impide el deterioro por microorganismos en una bebida dentro de un recipiente sellado durante un periodo de al menos 16 semanas.

5 Según otro aspecto de la invención, se proporciona un producto de bebida que comprende: un componente de bebida; un complejo de pimaricina-ciclodextrina en el que la bebida tiene un pH de 2,5 a 5,6; y la bebida cuando se coloca dentro de un recipiente sellado no se deteriora sustancialmente por microorganismos durante un periodo de al menos 16 semanas. La bebida es una bebida con alto contenido en ácido que tiene un pH de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 5,6 o de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 4,6.

Según un aspecto de la invención, se proporciona un sistema de conservante de bebidas que comprende: un complejo de pimaricina-ciclodextrina y povidona; en el que el sistema de conservante impide el deterioro por microorganismos en una bebida dentro de un recipiente sellado durante un periodo de al menos 16 semanas.

15 Según otro aspecto de la invención, se proporciona un producto de bebida que comprende: un componente de bebida; un complejo de pimaricina-ciclodextrina y povidona en el que la bebida tiene un pH de 2,5 a 5,6; y la bebida cuando se coloca dentro de un recipiente sellado no se deteriora sustancialmente por microorganismos durante un periodo de al menos 16 semanas. La bebida es una bebida con alto contenido en ácido que tiene un pH de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 5,6 o de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 4,6.

Según un aspecto de la invención, se proporciona un sistema de conservante de bebidas que comprende: un complejo de pimaricina-ciclodextrina y DMDC en el que el sistema de conservante de bebidas impide el crecimiento de microorganismos que producen deterioro en una bebida contenida mediante un envase y un sello (cierre) durante un periodo de al menos 16 semanas. Otro aspecto de la invención se refiere a una bebida que contiene el sistema de conservante de bebidas que comprende un complejo de pimaricina-ciclodextrina y DMDC.

Estos y otros aspectos, características y ventajas de la invención o de determinadas realizaciones de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la siguiente divulgación y descripción de realizaciones a modo de ejemplo.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un esquema de la relación huésped-hospedador entre pimaricina y ciclodextrina.

La figura 2 muestra un espectrograma de UV de pimaricina (para fines de cuantificación)

La figura 3 muestra espectros para pimaricina en metanol, en agua y en complejo con beta y alfa ciclodextrina.

La figura 4 muestra una cuadrícula de prueba típica para el establecimiento de la tolerancia hacia pimaricina en presencia o ausencia de complejo con ciclodextrina entre una serie de diferentes hongos de moho bioindicadores.

Descripción detallada

La presente invención se refiere a un sistema de conservante particularmente adecuado para bebidas que tienen un pH no mayor de pH 5,6 en el que la bebida se conserva durante un periodo de al menos 16 semanas. El sistema de conservante comprende un complejo de pimaricina-ciclodextrina.

La presente invención es particularmente eficaz en la prevención del deterioro de bebidas que puede iniciarse por o bien hifas o bien esporas de mohos vegetativos que pueden germinar para dar una forma vegetativa cuando están suspendidos en una bebida. Las formas de hongos que inhibe el sistema de conservante incluyen levaduras, mohos y formas dimórficas de hongos tal como se produce en *Yarrowia*, *Candida* y, posiblemente, *Brettanomyces*. Las esporas de mohos pueden no inactivarse por la presencia del sistema de conservante de la invención, pero o bien se impide la germinación de las esporas en presencia de la invención o bien se impide el crecimiento de la forma vegetativa del moho que resulta tras la germinación más allá de un pequeño número de replicaciones del ciclo celular.

La pimaricina es un compuesto bioactivo natural que sirve para impedir el crecimiento de hongos de levadura y moho. Históricamente, los límites de solubilidad y estabilidad de la pimaricina en sistemas acuosos impidieron el uso de este antimicrobiano en el papel de conservante de bebidas. Por sí misma, la pimaricina puede entrar en una disolución acuosa a 52 mg/l. Esto es casi 4 veces menos que la cantidad de pimaricina que debe añadirse a muchos tipos de bebida con el fin impedir el sobrecrecimiento de hongos de moho durante un periodo de 16 semanas, el límite de la vida útil de almacenamiento del producto. Además, la presencia de otros ingredientes, tales como ácido o azúcar, dificulta adicionalmente la capacidad de la pimaricina para entrar en disolución. Sólo la cantidad de pimaricina que está en disolución puede actuar como conservante. La notable formación de un precipitado de pimaricina en un sistema (bebida) es una clara indicación de que la capacidad de la pimaricina para inhibir el

crecimiento de moho se ha visto comprometida. Por tanto, los productos que contienen pimaricina en forma de un precipitado no son estables durante el periodo completo del requisito de vida útil de almacenamiento.

- 5 La presente invención se basa en el descubrimiento de que la pimaricina puede combinarse con una sustancia que sirve para aumentar la solubilidad de la pimaricina, sin alterar de manera medible la actividad de la pimaricina. El límite de solubilidad de la pimaricina en disolución (25°C) es de aproximadamente 52 mg por litro de disolución, pero una asociación entre pimaricina y ciclodextrina permite que la pimaricina permanezca en disolución hasta al menos 500 mg por litro, incluso a las temperaturas encontradas en vitrinas refrigeradas (8-10°C). Además, la pimaricina se mantiene en disolución en una forma que no precipita. Por tanto, los atributos de calidad del producto se mantienen.
- 10 La estabilización del producto durante un periodo de 16 semanas sin compromiso para los atributos de calidad del producto diferencia de manera medible la aplicación de esta invención de otros métodos de utilización de pimaricina como conservante de bebidas. La concentración independiente inicial mínima de pimaricina necesaria para conservar el producto durante un periodo de 16 semanas es de 400 mg de pimaricina por litro.
- 15 Se sabe que el sodio (Na+) y el cloruro (Cl-), cuando están presentes en razones específicas, interaccionan de una manera que da como resultado la formación de sal (cloruro de sodio), una sustancia que presenta características químicas y físicas diferentes de cualquiera de sus componentes. De manera similar, la pimaricina y ciclodextrina, cuando están presentes en una razón y concentración apropiadas, interaccionarán espontáneamente de una manera que produce un clatrato, un complejo o una estructura que comparte características de tanto un clatrato como un complejo. El clatrato-complejo presenta atributos químicos y físicos que son distintos de sus dos componentes. Como tal, la estructura química de la pimaricina-ciclodextrina es distinta de una pimaricina sola. Además, la interacción entre ciclodextrina y pimaricina es diferente de la que se produce entre un tensioactivo (solubilizante) en donde la interacción entre el "huésped" y el "hospedador" da como resultado un encapsulado micelar. En este caso, las interacciones hidrófobas dictan que el huésped estará enterrado en gran medida en el centro hidrófobo de la micela. Cuando se compleja con ciclodextrina, la pimaricina es todavía accesible a la disolución a granel y a la superficie del microorganismo.
- 20
- 25

En resumen, la pimaricina es por tanto un componente bioactivo natural que sirve para impedir el crecimiento de hongos de levadura y moho y la ciclodextrina sirve para mantener una distribución relativamente uniforme de la pimaricina por todo el volumen total ocupado por la bebida. El término "distribución relativamente uniforme" significa homogénea tal como se establece mediante los métodos de química analítica tradicionales o clásicos. El componente bioactivo puede concebirse como un "huésped" y el agente que sirve para mantener una distribución uniforme del huésped es el "hospedador". Un huésped puede interaccionar con un hospedador de una de dos formas. Cuando una asociación evoluciona debido a una transferencia de carga o a la formación de un enlace covalente coordinado, la asociación se denomina complejo. En el caso en el que el huésped simplemente se ajusta perfectamente en una cavidad proporcionada por el hospedador, la asociación es un clatrato. La mayoría de las asociaciones huésped-hospedador son una combinación de ambos fenómenos. La asociación entre pimaricina y una molécula de ciclodextrina está dirigida probablemente por ambas clases de interacción. La figura 1 muestra un esquema de la disposición probable para la relación huésped-hospedador entre pimaricina y ciclodextrina.

30

35

40 El complejo es distinto de las encapsulaciones. Permitiendo que "CD" represente una molécula de ciclodextrina y la letra "P" represente pimaricina, la naturaleza del complejo entre ciclodextrina y pimaricina puede representarse abreviadamente como $CD_n:P_n$ en la que el subíndice n = el número de o bien CD o bien P que son parte del complejo. Cuando una molécula de CD forma un complejo con una molécula de P, el complejo es 1:1 con respecto a CD y P y el complejo puede abreviarse CD_1P_1 . En términos generales, la forma $CD_1:P_1$ predominará, pero se producirá probablemente una ligera variación en la razón. Los ejemplos de otras formas de complejos incluyen $CD_1:P_2$, $CD_1:P_3$, o $CD_2:P_1$, $CD_3:P_1$ o $CD_2:P_2$ y CD_3P_3 . Debido a las dimensiones moleculares de la pimaricina en relación con la ciclodextrina, la mayoría de la estructura de la pimaricina sobresaldrá fuera del complejo. (Véase la figura 1 para una representación del complejo). El complejo puede concebirse en cuanto a una raqueta (pimaricina) agarrada por una mano (ciclodextrina). En consecuencia, el complejo que es probable que predomine es CD_1P_1 .

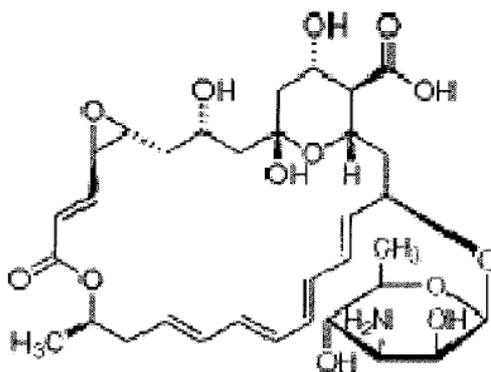
45

50

Otro nombre común para la pimaricina es natamicina. El nombre sistemático de la IUPAC para la natamicina es ácido (1R, 3S, 5R, 7R, 8E, 12R, 14E, 16E, 18E, 20E, 22R, 24S, 25R, 26S)-{[3S, 4S, 5S, 6R]-4-amino-3,5-dihidroxi-6-metiloxan-2-il]oxi}-1,3,26-trihidroxi-12-metil-10-oxo-6,11,28-trioxatriciclo[22.3.1.0^{5,7}]octacosa-8,14,16,18,20-pentaeno-25-carboxílico. Una segunda interpretación del nombre de la IUPAC para la pimaricina (C₃₃H₄₇NO₁₃) es ácido 22-[(3-amino-3,6-didesoxi-B-D-manopiranosil)-oxi]-1,3,26-trihidroxi-12-metil-10-oxo-6,11,28-trioxatriciclo[22.3.1.0^{5,7}]octacosa-8,14,16,18,20-pentaeno-25-carboxílico. A la pimaricina se le ha asignado el número CAS 7681-93-8. Está aprobada para su uso en al menos algunos alimentos (por ejemplo, el número de aditivo alimentario europeo es E235 (conservante) y E1201 (estabilizador) y la ADI recomendada es de 0-0,3 mg/kg de peso corporal.

55

60



Pimaricina

- 5 La pimaricina es un agente antifúngico eficaz (levaduras y mohos) y tiene una aprobación limitada para su uso en alimentos. El compuesto funciona a través de una interacción con un esteroide fúngico conocido como ergosterol, una sustancia presente sólo en hongos. En consecuencia, la pimaricina no se ha demostrado que sea tóxica en estudios en cultivo tisular o animales completos. Adicionalmente, se ha mostrado que los productos de degradación de la pimaricina no son tóxicos. Los productos de degradación de la pimaricina no difieren significativamente de los productos de degradación del colesterol. La degradación, si se produce en alguna medida, no está dirigida de manera medible por temperaturas por debajo de 37°C.

15 La pimaricina es un compuesto blanco, insípido e inodoro. La actividad antimicrobiana es estable a al menos exposiciones cortas a 48,9°C (120°F) y no se descompone a una velocidad medible a menos que las temperaturas excedan de 180°C (356°F). Desafortunadamente, tal como se indicó anteriormente, la pimaricina no es particularmente soluble en disoluciones acuosas. Demuestra una solubilidad en agua pura (25°C) de sólo 0,052 mg/ml (52 µg/ml), en donde el pH se estima que es de aproximadamente 6,4. (La pimaricina presenta un único grupo carboxílico que dirige el valor de pH ácido).

20 La pimaricina está presente en una bebida en una cantidad de al menos aproximadamente 25 mg/l a aproximadamente 400 mg/l, de al menos aproximadamente 25 mg/l a aproximadamente 250 mg/l, de al menos aproximadamente 50 mg/l a aproximadamente 200 mg/l o de al menos aproximadamente 75 mg/l a aproximadamente 150 mg/l.

25 La presencia de otros componentes de solutos (azúcares, vitaminas, etc.) y un pH distinto de 6,4 tendrá un impacto sobre la solubilidad, generalmente de una manera desfavorable. La pimaricina, por sí misma, no es lo suficientemente soluble en la bebida como para funcionar como conservante de bebidas. Por ejemplo, los resultados de prueba indican un límite de solubilidad de sólo 20 mg/l de pimaricina a 25°C pH 3,4 y 10 mg/l a 4°C y pH 3,4 en una bebida de zumo de manzana de 12 grados Brix. La pimaricina no es lo suficientemente soluble en la bebida como para funcionar como conservante de bebidas por sí misma. Además, al límite natural de solubilidad para la pimaricina, no puede funcionar de manera aditiva con otras sustancias conservantes dados los límites físicos, sensoriales o regulatorios sobre el uso de estos agentes antimicrobianos adjuntos. Por ejemplo, el ácido cinámico es un conservante adjunto particularmente bueno si puede emplearse a concentraciones a o por debajo de 30 mg/l en donde el impacto sobre el sabor puede mitigarse. Ácido cinámico 30 mg/l en combinación con pimaricina 10 mg/l no es una combinación de conservantes eficaz. Sin embargo, ácido cinámico 30 mg/l combinado con incluso pimaricina 200 mg/l es eficaz de manera medible.

40 Además, puede ser necesario emplear una concentración inicial relativamente alta de pimaricina con el fin de compensar la degradación que se produce cuando la pimaricina se expone a luz UV. Dicho de otro modo, puede ser necesario introducir pimaricina a una concentración inicial que excede ligeramente la concentración mínima requerida para inhibir el crecimiento (en ausencia de luz UV) con el fin de garantizar una cantidad suficiente de pimaricina a lo largo de toda la vida del producto. Se recuerda que los componentes de degradación de la pimaricina no son tóxicos y tampoco tienden a cambiar los atributos sensoriales del producto. Este problema puede abordarse también mediante la utilización de bloqueantes de UV o sustancias absorbentes de UV en la bebida.

45 La solubilidad de cualquier compuesto, incluyendo la pimaricina, no es una solubilidad absoluta y la solubilidad variará de manera medible en función del pH, la temperatura, la concentración molar de iones y la concentración de otros solutos (tales como edulcorante). En el caso específico de solubilidad en agua a 25°C (medida convencional para la solubilidad), el valor aceptado de solubilidad para la pimaricina es de 0,052 mg/ml (52 µg/ml). Se esperaría que una disolución de este tipo presentara un pH de 5-7,5 basándose en la observación de que una suspensión al 1% de pimaricina en agua desmineralizada presenta un pH de este tipo.

El otro componente del complejo es ciclodextrina. Algunas ciclodextrinas son sustancias naturales. Las

ciclodextrinas se emplean comúnmente en la industria farmacéutica y cosmética para fármacos complejos. La ciclodextrina puede potenciar la disolución, potenciar la solubilidad o potenciar la eficacia para proteger a la sustancia de reacciones químicas dañinas o para proporcionar una mitigación del impacto sensorial de la química en el complejo con los conservantes de ciclodextrina. Por ejemplo, el sabor desfavorable de la nicotina se mitiga mediante complejo con ciclodextrinas, lo que permite el uso de la sustancia en composiciones farmacológicas empleadas para reducir el ansia de cigarrillos. Adicionalmente, las ciclodextrinas pueden reducir la presión de vapor aparente u observada de sustancias volátiles con las que se compleja.

TABLA A

Ciclodextrina (CD)	Abreviatura
α -ciclodextrina	α -CD
β -ciclodextrina	β -CD
γ -ciclodextrina	γ -CD
Hidroxietyl- β -CD	HE- β -CD
Hidroxipropil- β -CD	HP- β -CD
Sulfobutil éter- β -CD	SBE- β -CD
Metil- β -CD	M- β -D
Dimetil- β -CD	DM- β -CD (DIMEB)
β -CD dimetilada al azar	RDM- β -CD
β -CD metilada al azar	RM- β -CD (RAMEB)
Carboximetil- β -CD	CM- β -CD
Carboximetiletil- β -CD	CME- β -CD
Dietil- β -CD	DE- β -CD
Tri-O-metil- β -CD	TRIMEB
Tri-O-etil- β -CD	TE- β -CD
Tri-O-butil- β -CD	TB- β -CD
Tri-O-valeril- β -CD	TV- β -CD
Di-O-hexanoil- β -CD	DH- β -CD
Glucosil- β -CD	G ₁ - β -CD
Maltosil- β -CD	G ₂ - β -CD
2-hidroxi-3-trimetil-amoniopropil- β -CD	HTMAPCD

No se esperaba que la pimaricina se complejara con ciclodextrina de una manera que fuera apropiada para su uso como conservante de bebidas. En primer lugar, y tal como se estableció anteriormente, la pimaricina es una molécula grande en relación con la cavidad de la ciclodextrina. En segundo, la pimaricina necesita complejarse con una ciclodextrina en una cantidad que sea suficiente para servir como conservante. En tercer lugar, la pimaricina necesitaría permanecer estable durante un periodo de tiempo necesario para funcionar como conservante y no producir un impacto negativo sobre el sabor u otros atributos sensoriales del producto. Hay numerosos informes en la bibliografía que citan la inestabilidad química general de la pimaricina en disolución. En cuarto lugar, otros ingredientes de la bebida no pueden desplazar de manera medible a la pimaricina de la ciclodextrina. El desplazamiento en cantidades medibles dará como resultado precipitación de la pimaricina y esto no sería aceptable desde la perspectiva de presentación al consumidor. Finalmente, la molécula de pimaricina debe "liberarse" del complejo en presencia de un microorganismo que produce deterioro y luego unirse irreversiblemente al microorganismo en preferencia a regresar al estado de complejo con ciclodextrina.

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos (azúcar) que presentan una estructura similar a un cono hueco, muy parecida a la encontrada en un donut. La ciclodextrina es un hidrato de carbono soluble en agua que presenta una región de núcleo central que es en gran medida hidrófoba. Puede hacerse que productos químicos que presentan determinadas propiedades físicas con respecto a tamaño, hidrofobicidad, polaridad y área de superficie interaccionen con grupos funcionales contenidos dentro del hueco de la ciclodextrina de manera que la molécula huésped queda abarcada por el anillo o donut de la ciclodextrina. A menudo, esta interacción sirve para enmascarar

una o más características físicas o químicas de la molécula huésped. En el grado en el que las características enmascaradas sean desfavorables con respecto a una función particular, el complejo ofrece una ventaja con respecto a la molécula no complejada. En el presente documento la ciclodextrina se denomina ligando u hospedador y la molécula que interacciona con la ciclodextrina es el huésped o soluto. La razón de hospedador con respecto a huésped es normalmente de 1:1 ó 2:1, pero otras razones son viables.

Aunque la química de las ciclodextrinas está bien establecida, hay sólo un grado limitado de comprensión entre los expertos en el campo sobre cómo predecir si una molécula interaccionaría con una molécula de ciclodextrina para formar un complejo y la magnitud de la interacción. Existe mucha menos comprensión en lo que respecta al alcance con el que un complejo superaría una deficiencia particular de la molécula huésped con respecto a un resultado final deseado. Incluso se comprende menos sobre cómo un complejo (hospedador y huésped) interaccionan con otros componentes contenidos dentro de un sistema. En virtud de estos hechos, las relaciones hospedador-huésped definidas en el presente documento para su uso como conservantes son únicas y no obvias.

La ciclodextrina y pimaricina se juntan de un modo tal que da como resultado la formación de un complejo. Aunque la pimaricina es una molécula bastante grande y no se ajustará completamente dentro del núcleo de la ciclodextrina, cadenas laterales específicas de la pimaricina sí interaccionan con la ciclodextrina de una manera que potencia la solubilidad acuosa de la pimaricina.

Generalmente, el complejo existirá de manera que la razón de pimaricina con respecto a ciclodextrina es de 1:1. Sin embargo, es posible que existan otras razones incluyendo 1:2, 1:3, 1:4, 2:1, 2:3 y 3:1. En la siguiente tabla II se identifican tipos representativos de ciclodextrinas. La unión de la pimaricina a estas alfa, beta y gamma ciclodextrina se cree que es predictiva de la unión de pimaricina a cualquier tipo de ciclodextrina porque todas las ciclodextrinas se derivan de estas 3 formas. Si una sustancia se une a beta ciclodextrina, no debe unirse menos fuertemente a formas modificadas de beta ciclodextrina.

Tabla B

Formas de ciclodextrina que son representativas de todas las formas de ciclodextrina	
Nombre de la ciclodextrina	Abreviatura
beta-ciclodextrina	β CD
gamma-ciclodextrina	γ CD
sulfobutil éter β-ciclodextrina	(SBE β CD)
hidroxipropil β-ciclodextrina	HP β CD
β-ciclodextrina metilada al azar	RM β CD
maltosil/dimaltosil β-ciclodextrina	M/DM/ β CD

Cuando se acopla para dar un complejo, la pimaricina posiblemente presentará características diferentes de la misma forma no complejada. Las características que puede presentar la pimaricina cuando está en un complejo con los compuestos de las tablas A o B incluyen 1) actividad antimicrobiana potenciada en relación con la forma libre, 2) solubilidad potenciada en suspensiones acuosas cuando está en el estado de complejo con ciclodextrina, 3) una actividad antifúngica observada que es suficiente para impedir el sobrecrecimiento y deterioro de productos de bebidas que presentan un pH de menos de 6 durante un periodo de tiempo igual a 16 semanas o más, y 4) estabilidad potenciada de la pimaricina en la bebida.

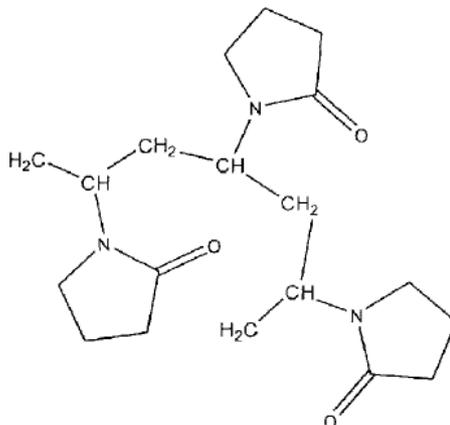
Un aspecto de la invención se refiere a un sistema de conservante de bebidas que comprende pimaricina a una concentración de al menos 100 mg/l que puede obtenerse debido al complejo formado con la ciclodextrina. Más normalmente, se prepararán formulaciones de bebida para que contengan una concentración inicial de pimaricina de 350-400 mg/l. Esta concentración inicial objetivo compensará la degradación que puede producirse en ausencia de bloqueantes de UV o componentes absorbentes de UV de las bebidas. Por ejemplo, las bebidas de agua fortificada no contendrán probablemente sustancias absorbentes de UV que puedan proteger a la ciclodextrina.

El pH de la bebida puede ser cualquier pH en el intervalo 2,5-5,6. La actividad de la pimaricina es independiente de manera medible del pH en el intervalo de 2,5-6. Por encima de pH 6,0, la actividad sólo disminuye ligeramente pero esto puede compensarse mediante la adición de concentraciones ligeramente superiores de pimaricina. Intervalos pH típicos son de 2,5 a 5,6 y de 2,5 a 4,6.

Además de la pimaricina y la ciclodextrina, otro componente puede ser povidona (polivinilpirrolidona) (CAS 9003-39-8). Otros nombres formales incluyen homopolímero de 1-etnil-2-pirrolidona, poli[1-(2-oxo-1-pirrolidinil)etileno], cros-povidona y 1-vinil-2-pirrolidinona-polímero). Las abreviaturas y otros nombres comúnmente empleados incluyen PNVP, povidona y polividona). La povidona es un polímero de vinilpirrolidona. Como tal, puede prepararse de

diversas longitudes a través de la adición de unidades de monómero sucesivas. Normalmente, una preparación de povidona presentará una mezcla de polímeros de longitudes ligeramente diferentes en la que puede establecerse una longitud promedio y un intervalo de longitud a través de métodos analíticos. Es común encontrar preparaciones comerciales que se caracterizan por una longitud promedio diferente o un intervalo diferente de longitudes o ambos.

5



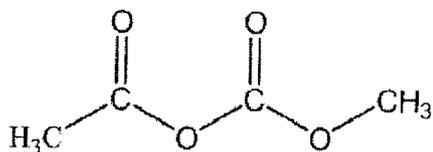
Povidona

- 10 La povidona se denomina agente o material de suspensión. La povidona también parece presentar características de sustancias conocidas como hidrótopos. Como tal, la povidona puede emplearse como vehículo para extender el límite de solubilidad de varios compuestos y fármacos. La frase “extender el límite de solubilidad” pretende significar que el límite superior de solubilidad se ha aumentado para una sustancia que entre en una disolución que está compuesta predominantemente por agua (sistema acuoso). Un litro de agua pura presenta una concentración de
- 15 agua igual a 55,5 moles por litro o 1000 g/l. El agua sigue siendo el componente principal en una bebida incluso tras sustituir parte del agua por ingredientes de bebidas.

- Sin embargo, es difícil predecir si puede emplearse povidona para extender la solubilidad de una sustancia bioactiva sin comprometer la bioactividad. Aunque los extensores de la solubilidad pueden mejorar la solubilidad de un
- 20 compuesto activo, pueden alterar la actividad del compuesto activo haciendo que tal compuesto sea ineficaz. Además, los componentes de una bebida pueden desplazar a la pimaricina del complejo con povidona dando como resultado un precipitado.

- Aunque sin querer restringirse a ninguna teoría, la povidona puede retrasar la formación de interacciones pimaricina-pimaricina promoviendo así las interacciones pimaricina-ciclodextrina. Además, la povidona puede servir para impedir interacciones entre dos o más ciclodextrina:pimaricina complejadas. Se añade una cantidad eficaz de povidona para ayudar en la solubilidad de la pimaricina, retrasar la formación de interacciones pimaricina-pimaricina y/o promover interacciones pimaricina-ciclodextrina. Generalmente, la cantidad de povidona añadida es del 0,5% en
- 25 peso al 10% en peso basándose en el peso total de la bebida.

- 30 Puede incluirse dicarbonato de dimetiló en la presente formulación de conservante.



- 35 El dicarbonato de dimetiló (DMDC) sólo es eficaz hacia organismos bacterianos y fúngicos que están en el estado vegetativo. El DMDC no es activo contra el estado de espóra de los organismos. Muchos tipos de organismos que producen deterioro pueden convertirse entre estados vegetativo y de espóra. Las esporas con estructuras latentes que consisten en un recubrimiento endurecido que abarca los remanentes específicos del estado vegetativo que se requieren para que el organismo reinstaure el crecimiento (germinación). El estado de espóra ofrece protección
- 40 frente a agentes químicos y físicos que son letales para las formas vegetativas.

- El DMDC se ve sometido a una descomposición rápida en sistemas acuosos, y la velocidad de degradación es tan rápida que no hay posibilidad para la acción de DMDC residual sobre esporas de mohos ya que tales esporas generalmente comienzan a germinar de 1 a 2 horas después de exponerse a la bebida (esporas que son
- 45 contaminantes en virtud de la asociación con superficies en contacto con los alimentos de los materiales de envasado). Por tanto, no puede emplearse DMDC como conservante independiente porque es inactivo contra

esporas de mohos y se disipa antes de que pueda actuar sobre cualquier espora que germine en el producto.

El fabricante de DMDC notifica que la concentración de DMDC requerida para estabilizar la bebida durante un periodo de 16 semanas frente al sobrecrecimiento de formas vegetativas de levaduras, mohos y bacterias es de al menos 250 mg/litro. Este es el límite legal para su uso dentro de los EE.UU. En la presente invención, se usa DMDC a una concentración de entre aproximadamente 75 mg/l y 250 mg/l, generalmente entre aproximadamente 100 mg/l y aproximadamente 200 mg/l.

Debe indicarse que la pimaricina es relativamente tolerante a exposiciones cortas al calor y que está completamente dentro del alcance de la invención emplear un complejo de pimaricina-ciclodextrina conjuntamente con un proceso térmico. Tras un proceso térmico que destruye formas vegetativas de hongos y bacterias, estaría presente pimaricina para hacer frente a las consecuencias de la germinación de esporas de mohos. Normalmente, un proceso térmico de 2 minutos a 140°F es suficiente para proporcionar un producto que es comercialmente estéril en relación con bacterias, levaduras y mohos vegetativos. La pimaricina se degrada a 356°F.

Aspectos de la invención se refieren a conservar una amplia gama de productos de bebidas frente al deterioro por levaduras, mohos y una amplia gama de bacterias tolerantes a ácidos. Los productos de bebidas presentan un pH de hasta 5,6, tal como de 2,5 a 5,6, de 2,5 a 4,6 o de 2,6 a 3,8. La conservación del producto puede lograrse simplemente a través de la adición de los agentes químicos descritos en el presente documento, pero también es posible suplementar la acción de los productos químicos con formas puramente físicas de conservación tal como alteración de la temperatura del producto, diversas longitudes de onda de irradiación, presión o combinaciones de los mismos.

En disolución por sí misma, la pimaricina presentará un pH. De manera similar, una mezcla de pimaricina, ciclodextrina y povidona (sistema de conservación) en agua presentará un pH. Sin embargo, el pH del sistema de conservante en sí mismo no es particularmente relevante. Sólo una cantidad muy pequeña se añadirá a la bebida y el pH de la bebida prevalecerá. El pH de la bebida que contiene el sistema de conservante puede ajustarse a cualquier valor especificado.

El complejo de pimaricina-ciclodextrina puede complementarse mediante la presencia de otras sustancias que se sabe que presentan actividad antimicrobiana. La combinación de dos o más sustancias antimicrobianas en una única formulación permite la posibilidad de un "efecto de múltiples obstáculos" en el que se inhiben múltiples procesos metabólicos hasta un grado tal que el organismo no puede crecer y reproducirse. Sustancias tales como secuestrantes, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos, tales como terpenos, pueden emplearse con la pimaricina.

El sistema de conservante de bebidas puede comprender además ácido sórbico, ácido cinámico, sal de ácido cinámico, o una mezcla de ácido sórbico y cinámico, sales alcalinas de ácido sórbico (K⁺, Na⁺) y/o sales alcalinas de ácido cinámico (K⁺, Na⁺) que dan como resultado concentraciones específicas de ácido sórbico o cinámico tal como se determina mediante el pH final de la bebida.

El sistema de conservante de bebidas puede comprender además un secuestrante biodegradable seleccionado del grupo que consiste en ácido etilendiamina-N,N'-disuccínico (EDDS), ácido etilendiamina-N,N'-dimalónico (EDDM), ácido etilendiamina-N,N'-diglutárico (EDDG), y mezclas de los mismos, y un pH de 5,8 o menos; en el que el sistema de conservante de bebidas impide el deterioro por microorganismos en una bebida dentro de un recipiente sellado durante un periodo de al menos 16 semanas.

El sistema de conservante de bebidas puede comprender además hexametáfosfato de sodio (SHMP), metafosfato ácido de sodio (SAMP) o una mezcla de SHMP y SAMP hasta una cantidad total prescrita. Dentro del intervalo de pH de 2,5 a 5,8, SAMP y SHMP pueden sustituirse uno por otro en una razón de 1:1 sin comprometer el efecto antimicrobiano. La sustitución de uno por otro a menudo es una cuestión de percepción sensorial, particularmente "sensación en la boca".

El sistema de conservante de bebidas puede comprender además fosfonato hasta una cantidad total prescrita en el que la composición contiene cualquier número de tipos de estructuras de fosfonato de manera que se logra una cantidad total de fosfonato.

El sistema de conservante de bebidas puede comprender además bis-fosfonato hasta una cantidad total prescrita en el que la composición contiene cualquier número de tipos de estructuras de bis-fosfonato de manera que se logra una cantidad total de bis-fosfonato.

El sistema de conservante de bebidas puede comprender además N-bis-fosfonato hasta una cantidad total prescrita en el que la composición contiene cualquier número de tipos de estructuras de N-bis-fosfonato de manera que se logra una cantidad total de bis-fosfonato.

El sistema de conservante de bebidas puede comprender además un eliminador de radicales (antioxidante) tal como ácido ascórbico en el que el antioxidante-eliminador tiene un papel definido como componente del sistema de

conservante de bebidas.

En algunos casos de cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, puede ser necesario que esté presente EDTA cuando el fin es estabilizar ingredientes químicos. Cuando se añade para este fin, cumplirá el segundo papel no previsto si participa como conservante antimicrobiano no previsto. Para cumplir el papel de estabilización de ingredientes químicos, no es necesario que el EDTA esté presente en una cantidad mayor de 30 mg/l o una cantidad de EDTA en lugar de secuestrantes biodegradables que no excede de 45 mg/l.

En general, el sistema de conservante de bebidas o producto de bebida de la invención debe tener una concentración total de cationes de cromo, aluminio, níquel, zinc, cobre, manganeso, cobalto, calcio, magnesio y hierro en el intervalo de aproximadamente 1,0 mM o menos, por ejemplo, de aproximadamente 0,5 mM a 0,75 mM, aproximadamente 0,54 mM o menos. La presente invención puede incluir opcionalmente el uso de agua para procesar un producto que se ha tratado para eliminar cationes metálicos. En contraposición a las enseñanzas del documento US 6.268.003, el método de tratamiento preferido es por medio de los procesos físicos ósmosis inversa y/o electrodesionización. El tratamiento por medios químicos, tal como se enseña en el documento US 6.268.003, es aceptable, pero no se prefiere. El uso de medios químicos para reducir la dureza del agua da como resultado a menudo un aumento en la concentración de cationes monovalentes específicos, por ejemplo, cationes de potasio, que sirven para comprometer la invención descrita en el presente documento. En determinadas realizaciones a modo de ejemplo, el agua añadida se ha tratado mediante ósmosis inversa, electrodesionización o ambas para disminuir la concentración total de cationes metálicos de cromo, aluminio, níquel, zinc, cobre, manganeso, cobalto, calcio, magnesio y hierro hasta aproximadamente 1,0 mM o menos.

Tal como se entiende comúnmente en la técnica, las definiciones de los términos “conservar”, “conservante” y “conservación” no proporcionan un periodo de tiempo convencional durante el que el producto que va a conservarse se mantiene libre de deterioro, descomposición o alteración del color. El periodo de tiempo para la “conservación” puede variar enormemente dependiendo de la materia. Sin un periodo de tiempo establecido, puede ser difícil o imposible deducir el periodo de tiempo requerido para que una composición actúe como “conservante”.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “conservar”, “conservante” y “conservación” se refieren a un producto de bebida o alimenticio protegido frente o a una composición que puede detener o impedir completamente el deterioro de un producto que es el resultado del crecimiento de microorganismos que producen deterioro durante un periodo de al menos 16 semanas. Este periodo es conforme al tiempo requerido para transportar un producto de bebida desde una ubicación de fabricación, a través de canales de distribución, hasta el consumidor. La ausencia de deterioro se observa por la ausencia de cualquier evidencia de crecimiento de organismos que producen deterioro (turbidez, recuento viable, recuento microscópico directo u otros métodos convencionales de enumeración) y por la ausencia de cualquier cambio discernible en los atributos del producto que podría atribuirse rutinariamente al metabolismo de organismos que producen deterioro.

Tal como se usa en el presente documento, el término “inhibir” se entiende que significa detener o impedir completamente.

Normalmente, el producto se conserva en condiciones ambientales, que incluyen el intervalo completo de temperaturas experimentadas durante el almacenamiento, el transporte y la exposición (por ejemplo, de 0°C a 40°C, de 10°C a 30°C, de 20°C a 25°C) sin limitación en la duración de la exposición a cualquier temperatura dada.

“Concentración inhibitoria mínima” (CIM) es otro término para el que no se define o se entiende de manera rutinaria un periodo de tiempo convencional. En los campos médicos, la CIM se emplea frecuentemente para designar la concentración de una sustancia que impide el crecimiento de un único tipo de microorganismo en una incubación durante la noche en comparación con un control positivo sin la sustancia (véase la Wikipedia). Sin embargo, el resto de la comunidad científica ha adoptado el término CIM queriendo decir cualquiera de varias condiciones de periodo de incubación y grado de inhibición.

Incluso dentro del campo médico, se reconoce que un valor de CIM desarrollado a lo largo de un periodo de 24 horas de incubación puede no ser el mismo valor desarrollado tras 48 horas o más. Dicho de otro modo, una sustancia puede presentar una CIM observable durante las primeras 24 horas de un experimento, pero no presentar CIM medible en relación con el control positivo tras 48 horas.

Los productos de bebidas según la presente invención incluyen tanto bebidas carbonatadas como no carbonatadas. En el presente documento, el término bebida carbonatada incluye cualquier combinación de agua, zumo, aroma y edulcorante que pretende consumirse como un líquido libre de alcohol y que también se prepara para que presente una concentración de dióxido de carbono de 0,2 volúmenes de CO₂ o más. El término “volumen de CO₂” se entiende que significa una cantidad de dióxido de carbono absorbida en el líquido en el que un volumen de CO₂ es igual a 1,96 gramos de dióxido de carbono (CO₂) por litro de producto (0,0455 M) a 25°C. Los ejemplos no inclusivos de bebidas carbonatadas incluyen aguas de Seltz aromatizadas, zumos, cola, limón-lima, refresco de jengibre y bebidas de cerveza de raíz que se carbonatan igual que los refrescos, así como bebidas que proporcionan beneficios de salud o bienestar por la presencia de sustancias metabólicamente activas, tales como vitaminas, aminoácidos,

proteínas, hidratos de carbono, lípidos o polímeros de los mismos. Tales productos pueden formularse también para que contengan leche, café o té u otros sólidos botánicos. También es posible formular tales bebidas para que contengan uno o más nutracéuticos. En el presente documento, un nutracéutico es una sustancia que se ha mostrado que presenta, mínimamente, o bien un beneficio para la salud general o específico o bien una sensación de bienestar tal como se documenta en textos o revistas profesionales. Sin embargo, los nutracéuticos no actúan necesariamente o bien curando o bien previniendo tipos específicos de condiciones médicas.

En el presente documento, el término “bebida no carbonatada” es cualquier combinación de agua y un ingrediente que pretende consumirse igual que una bebida líquida sin alcohol y que presenta no más de 0,2 volúmenes de dióxido de carbono. Los ejemplos no inclusivos de bebidas no carbonatadas incluyen aguas aromatizadas, té, café, néctares, bebidas minerales, bebidas deportivas, aguas vitaminadas, bebidas que contienen zumo, ponches o las formas concentradas de estas bebidas, así como concentrados de bebidas que contienen al menos aproximadamente el 45% en peso de zumo. Tales bebidas pueden suplementarse con vitaminas, aminoácidos, sustancias a base de proteínas, a base de hidratos de carbono o a base de lípidos. Tal como se indica, la invención incluye productos que contienen zumo, ya sean carbonatados o no carbonatados. “Bebidas que contienen zumo” o “bebidas de zumo”, independientemente de si están carbonatadas o no, son productos que contienen algunos o todos los componentes de una fruta, vegetal o frutos secos o mezcla de los mismos que pueden o bien suspenderse o bien solubilizarse en la fracción líquida natural de la fruta.

El término “vegetal”, cuando se usa en el presente documento, incluye tanto porciones fructíferas como no fructíferas pero comestibles de plantas tales como tubérculos, hojas, cáscaras y también, si no se indica lo contrario, cualquier grano, fruto seco, vaina y brote que se proporcione como zumos o aromatizantes de bebidas. A menos que lo dicten agencias reguladoras locales, nacionales o regionales, la eliminación selectiva de determinadas sustancias (pulpa, pectinas, etc.) no constituye una adulteración de un zumo.

A modo de ejemplo, pueden obtenerse productos de zumo y bebidas de zumo de la fruta de manzana, arándano rojo, pera, melocotón, ciruela, albaricoque, nectarina, uva, cereza, pasa, frambuesa, grosella espinosa, mora, arándano azul, fresa, limón, naranja, pomelo, fruta de la pasión, mandarina, ciruela mirabel, tomate, lechuga, apio, espinaca, repollo, berro, diente de león, ruibarbo, zanahoria, remolacha, pepino, piña, chirimoya, coco, granada, guayaba, kiwi, mango, papaya, sandía, lo han guo, melón, piña, plátano o puré de plátano, limón, mango, papaya, lima, mandarina, y mezclas de los mismos. Zumos preferidos son los zumos de cítricos, y los más preferidos son los zumos que no son de cítricos, manzana, pera, arándano rojo, fresa, uva, papaya, mango y cereza.

La invención podría usarse para conservar una formulación que es esencialmente el 100% de zumo pero el producto no puede etiquetarse como que contiene el 100% de zumo. La invención puede usarse en productos que contienen zumo en los que la concentración de zumo está por debajo del 100%. La disminución de la concentración de zumo por debajo del 10% normalmente favorecerá el uso de concentraciones disminuidas de conservantes. Formulaciones que contienen concentraciones de zumo tan altas como el 10% pueden conservarse mediante esta invención y ciertamente una bebida que contiene menos del 10% de zumo se conservaría mediante esta invención, una bebida que contiene no más del 5% de zumo se conservaría mediante esta invención. Puede usarse cualquier zumo para preparar la bebida de esta invención. Si se desea un concentrado de bebida, el zumo de fruta se concentra por medios convencionales desde aproximadamente 12° Brix hasta aproximadamente 65° Brix. Los concentrados de bebidas tienen habitualmente 40° Brix o más (de aproximadamente el 40% a aproximadamente el 75% de sólidos de azúcar).

Normalmente, las bebidas presentarán un intervalo especificado de acidez. La acidez de una bebida está determinada en gran medida por el tipo de acidulante, su concentración y la propensión de los protones asociados con el ácido a disociarse del ácido cuando el ácido está en disolución (pK_A). Cualquier disolución con un pH medible entre 0-14 presenta algunos, tal como se refleja en la concentración medible o calculable de protones libres. Sin embargo, las disoluciones con pH por debajo de 7 se entienden generalmente que son ácidas y aquellas por encima de pH 7 se entienden que son básicas. El acidulante puede ser orgánico o inorgánico. Un ejemplo no exclusivo de ácidos inorgánicos son ácidos fosfóricos. Ejemplos no exclusivos de ácidos orgánicos son ácido cítrico, málico, ascórbico, tartárico, láctico, glucónico y succínico. Ejemplos no exclusivos de ácidos inorgánicos son los compuestos de ácido fosfórico y las sales de mono y dipotasio sales de estos ácidos. (Las sales de mono y dipotasio de ácido fosfórico presentan al menos un protón que puede contribuir a la acidez).

Los diversos ácidos pueden combinarse con sales de los mismos ácidos o diferentes con el fin de gestionar el pH o la capacidad de tampón de la bebida a un pH o intervalo de pH especificado. La invención puede funcionar a un pH tan bajo como 2,6, pero la invención funcionará mejor a medida que el pH aumenta desde 2,6 hasta pH 5,6. Para bebidas muy ácidas, la invención no está limitada por el tipo de acidulante empleado en la acidificación del producto. Puede usarse prácticamente cualquier sal de ácido orgánico siempre que sea comestible y no proporcione un aroma extraño. La elección de la sal o mezcla de sales estará determinada por la solubilidad y el sabor. Citrato, malato y ascorbato producen complejos ingeribles cuyos aromas se determina que son bastante aceptables, particularmente en bebidas de zumo de fruta. El ácido tartárico es aceptable, particularmente en bebidas de zumo de uva, como también el ácido láctico. Pueden usarse ácidos grasos de cadena más larga pero pueden afectar al aroma y la solubilidad en agua. Para esencialmente todos los fines, son suficientes los restos de malato, gluconato, citrato y

ascorbato.

Determinadas realizaciones a modo de ejemplo del producto de bebida de la invención incluyen bebidas deportivas (que equilibran los electrolitos) (carbonatadas o no carbonatadas). Las bebidas deportivas típicas contienen agua, jarabe de sacarosa, jarabe de glucosa-fructosa y aromas naturales o artificiales. Estas bebidas pueden contener también cloruro de sodio, ácido cítrico, citrato de sodio, fosfato de mono-potasio, así como otras sustancias naturales o artificiales que sirven para reponer el equilibrio de electrolitos perdido durante la transpiración.

En determinadas realizaciones a modo de ejemplo, la presente invención también incluye formulaciones de bebida suplementada con vitaminas liposolubles. Los ejemplos no exclusivos de vitaminas incluyen vitamina E liposoluble o sus ésteres, vitamina A o sus ésteres, vitamina K y vitamina D3, especialmente vitamina E y acetato de vitamina E. La forma del suplemento puede ser polvo, gel o líquido o una combinación de los mismos. Las vitaminas liposolubles pueden añadirse en una cantidad de restauración, es decir suficiente para reemplazar a la vitamina presente de manera natural en una bebida tal como zumo o leche, que puede haberse perdido o inactivado durante el procesamiento. Las vitaminas liposolubles pueden añadirse también en una cantidad nutricional suplementaria, es decir una cantidad de vitamina considerada aconsejable para que la consuma un niño o adulto basándose en las CDR y otras normas de este tipo, preferiblemente de desde aproximadamente una hasta tres veces la CDR (cantidad diaria recomendada). Otras vitaminas que pueden añadirse a las bebidas incluyen vitamina B niacina, ácido pantoténico, ácido fólico, vitamina D, vitamina E, vitamina B y tiamina. Estas vitaminas pueden añadirse a niveles de desde el 10% hasta el 300% de la CDR.

Suplementos: La invención puede verse comprometida por la presencia de determinados tipos de suplementos pero esto no es incuestionable y variará de formulación de bebida a formulación de bebida. El grado en el que la invención se ve comprometida dependerá de la naturaleza del suplemento y la concentración resultante de cationes metálicos específicos en la bebida como consecuencia de la presencia del suplemento. Por ejemplo, suplementos de calcio pueden comprometer la invención, pero no en el mismo grado que suplementos de cromo. Pueden añadirse suplementos de calcio hasta el grado que no se exceda un valor crítico de concentración de calcio total. Las fuentes de calcio que son compatibles con la invención incluyen complejos de calcio-ácido orgánico. Entre las fuentes de calcio preferidas está "citrato-malato de calcio", tal como se describe en la patente estadounidense n.º 4.786.510 y la patente estadounidense n.º 4.786.518 concedidas a Nakel *et al.* (1988) y la patente estadounidense n.º 4.722.847 concedida a Heckert (1988). Otras fuentes de calcio compatibles con la invención incluyen acetato de calcio, tartrato de calcio, lactato de calcio, malato de calcio, citrato de calcio, fosfato de calcio, orotato de calcio, y mezclas de los mismos. También pueden incluirse cloruro de calcio y sulfato de calcio; sin embargo a niveles superiores tienen un sabor astringente.

Componente de aroma: Los productos de bebidas según la presente invención pueden contener aromas de cualquier tipo. El componente de aroma de la presente invención contiene aromas seleccionados de aromas artificiales, naturales, aromas botánicos, aromas a fruta y mezclas de los mismos. El término "aroma botánico" se refiere a aromas derivados de partes de una planta distintas del fruto; es decir derivadas de la vaina, los frutos secos, la corteza, las raíces y las hojas. También se incluyen dentro del término "aroma botánico" aromas preparados de manera sintética para simular aromas botánicos derivados de fuentes naturales. Los ejemplos de tales aromas incluyen cacao, chocolate, vainilla, café, cola, té, y similares. Los aromas botánicos pueden derivarse de fuentes naturales tales como aceites esenciales y extractos, o pueden prepararse de manera sintética. El término "aromas a fruta" se refiere a los aromas derivados de la parte reproductora comestible de una planta con semillas, especialmente una que tiene una pulpa dulce asociada con la semilla. También se incluyen dentro del término "aroma a fruta" aromas preparados de manera sintética producidos para simular aromas a fruta derivados de fuentes naturales.

También pueden emplearse aromas artificiales. Los ejemplos no exclusivos de aromas artificiales incluyen chocolate, fresa, vainilla, cola o aromas artificiales que imitan un aroma natural y pueden usarse para formular una bebida carbonatada o no carbonatada aromatizada para que sepa como una fruta. La cantidad particular del componente de aroma eficaz para conferir características de aroma a las mezclas de bebida de la presente invención ("potenciación del aroma") pueden depender del/de los aroma(s) seleccionado(s), la impresión de aroma deseada y la forma del componente de aroma. El componente de aroma puede comprender al menos el 0,005% en peso de la composición de bebida.

Basándose en cada caso, el sistema de conservante de bebidas según la presente invención es compatible con bebidas formuladas para contener una esencia acuosa. Tal como se usa en el presente documento, el término "esencia acuosa" se refiere al aroma soluble en y a los materiales de aroma que se derivan de zumos de fruta. Las esencias acuosas pueden ser esencias fraccionadas, concentradas o plegadas, o enriquecidas con componentes añadidos. Tal como se usa en el presente documento, el término "aceite de esencia" se refiere al aceite o fracción insoluble en agua del aroma y productos volátiles de sabor obtenidos a partir de zumos. El aceite de esencia de naranja es la fracción oleosa que se separa de la esencia acuosa obtenida mediante evaporación de zumo de naranja. El aceite de esencia puede fraccionarse, concentrarse o enriquecerse. Tal como se usa en el presente documento, el término "aceite de cáscara" se refiere al aroma y sabor derivados de naranjas y otras frutas cítricas y está compuesto en gran medida por hidrocarburos de terpeno, por ejemplo cetonas y aldehídos alifáticos, terpenos

oxigenados y sesquiterpenos. Se usa desde aproximadamente el 0,002% hasta aproximadamente el 1,0% de esencia acuosa y aceite de esencia en zumos aromatizados de cítricos.

5 Componente edulcorante: La función de conservación microbiológica de la presente invención en una formulación de bebida de una única concentración no se ve afectada por el tipo de edulcorantes presentes en la bebida. El edulcorante puede ser cualquier edulcorante comúnmente empleado para su uso en bebidas. Los edulcorantes adecuados para su uso en diversas realizaciones de las bebidas dadas a conocer en el presente documento incluyen edulcorantes nutritivos y no nutritivos, naturales y artificiales o sintéticos. El edulcorante puede incluir un monosacárido o un disacárido. Se esperará un determinado grado de pureza con respecto a la contaminación por cationes metálicos. También se permiten péptidos que presentan sabor dulce. Los sacáridos más comúnmente empleados incluyen sacarosa, fructosa, dextrosa, maltosa y lactosa y azúcar invertido. Pueden usarse mezclas de estos azúcares. Pueden usarse otros hidratos de carbono naturales si se desea menos o más dulzor. Se seleccionan edulcorantes no nutritivos adecuados y combinaciones de tales edulcorantes por las características nutricionales deseadas, perfil de sabor para la bebida, sensación en la boca y otros factores organolépticos. Los edulcorantes artificiales no nutritivos adecuados para al menos determinadas realizaciones a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, edulcorantes a base de péptidos, por ejemplo, aspartamo, neotamo y alitama, y edulcorantes no a base de péptidos, por ejemplo, sacarina sódica, sacarina cálcica, acesulfamo potásico, ciclamato de sodio, ciclamato de calcio, neohesperidina dihidrochalcona y sucralosa. En determinadas realizaciones a modo de ejemplo el producto de bebida emplea aspartamo como edulcorante, o bien solo o bien con otros edulcorantes. En otras determinadas realizaciones a modo de ejemplo el edulcorante comprende aspartamo y acesulfamo potásico. Otros edulcorantes no nutritivos adecuados para al menos determinadas realizaciones a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, sorbitol, manitol, xilitol, glicirricina, D-tagatosa, eritritol, meso-eritritol, malitol, maltosa, lactosa, fructo-oligosacáridos, polvo de Lo Han Guo, mogróside V, glicirricina, glicósidos de esteviol, por ejemplo, rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido E, esteviolbiósido, esteviósido, dulcósido A etc., extracto de *Stevia rebaudiana*, acesulfamo, aspartamo, otros dipéptidos, ciclamato, sucralosa, sacarina, xilosa, arabinosa, isomaltosa, lactitol, maltitol, trehalosa, ribosa, monatina, y edulcorantes proteicos tales como taumatina, monelina, brazzeína, D-alanina y glicina, compuestos relacionados, y mezclas de cualquiera de ellos. Está dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, dado el beneficio de esta divulgación, seleccionar edulcorantes nutritivos y no nutritivos adecuados y combinaciones de los mismos. La cantidad del edulcorante eficaz en las mezclas de bebida de la invención depende del edulcorante particular usado y la intensidad de dulzor deseada.

Atmósfera del espacio de cabeza: La presencia de aire en el espacio de cabeza del producto de bebida no tendrá un impacto medible sobre la composición de la invención. La presencia de gas dióxido de carbono u otros gases que provocan la exclusión de oxígeno de la bebida (nitrógeno, óxido nitroso, etc.) puede permitir el uso de concentraciones reducidas de conservantes químicos empleados junto con los secuestrantes. La concentración de secuestrantes requerida estará dictada sólo por el tipo y la cantidad de cationes metálicos que están presentes en el producto de bebida.

Tal como se estableció anteriormente, se ofrece en la figura 1 una disposición probable del complejo entre ciclodextrinas y pimaricina. La disposición es teórica y se basa en gran medida en el hecho de que el ácido carboxílico y los grupos amino confieren una polaridad en el extremo (lado) de pimaricina que interaccionaría preferentemente con la porción de agua de un disolvente. El extremo opuesto (lado) de pimaricina es en gran medida hidrófobo y presenta una dimensión (radio de van der waals + longitud de enlace) que debe permitir fácilmente su inclusión en ciclodextrinas tanto β como γ . Una fracción más pequeña de pimaricina podrá ajustarse dentro de una molécula de alfa ciclodextrina. La invención no se restringe a esta representación teórica del complejo. La prueba más exigente de la formación de un complejo es la diferencia en la solubilidad relativa de pimaricina en presencia de ciclodextrina en relación con el límite de solubilidad en ausencia de ciclodextrina. Hay numerosas herramientas analíticas para establecer la concentración de pimaricina, pero la espectroscopía de UV-visible es la más sencilla.

Volviendo a la figura 2, puede observarse que la pimaricina presenta un perfil de absorción de UV distintivo. Se entiende que los picos 1, 2, y 3 pueden atribuirse al cromóforo del conjugado que existe como consecuencia de la estructura de polieno (todo trans tetraeno) tal como se resalta (rectángulo discontinuo). Las ciclodextrinas (alfa, beta, y gamma) no absorben de manera medible luz UV en la región de 280-340 nm y por eso es posible de manera fácil establecer la concentración de pimaricina en disolución o en complejo a través de la aplicación básica de la ley de Beers.

La figura 3 muestra los espectros para la pimaricina en metanol, pimaricina en complejo con o bien a-ciclodextrina o b-ciclodextrina y pimaricina en agua. Tras una inspección cercana, los espectros revelan dos factores que sugieren un complejo entre ciclodextrina y pimaricina. En primer lugar, en relación con pimaricina en agua, pimaricina en metanol y pimaricina en presencia de las ciclodextrinas presentan un ligero desplazamiento al azul (hipocrómico) del pico 3. En segundo lugar, la razón de altura del pico 2 en relación con 1 cambia para pimaricina en metanol o en complejo con ciclodextrina en relación con agua. Existe un cambio similar, pero menos dramático, en la razón de altura de picos entre complejo de ciclodextrina-pimaricina y pimaricina en agua. Tanto el cambio en la razón de altura de picos como el desplazamiento al azul son indicativos de la formación de un complejo entre ciclodextrina y pimaricina. Lo más importante, pimaricina en complejo con ciclodextrina mayor de manera medible que lo que puede

lograrse en ausencia de ciclodextrina. (Esta figura no representa concentraciones máximas relativas. Para el fin de esta presentación, las disoluciones de complejo de α -ciclodextrina-pimaricina y pimaricina se diluyen en agua 10 veces y las disoluciones de pimaricina en metanol y complejada con β -ciclodextrina se diluyen 100 veces).

- 5 La figura 4 muestra una cuadrícula de prueba típica para el establecimiento de la tolerancia hacia pimaricina en complejo con ciclodextrina entre una serie de diferentes hongos de moho bioindicadores. Normalmente, se prepara una bebida en dos alícuotas, una con y otra sin pimaricina. Las dos alícuotas pueden mezclarse entre sí en diferentes proporciones con el fin de obtener un intervalo de concentraciones de pimaricina. En este ejemplo particular, se sometió a prueba la pimaricina en ausencia de ciclodextrina y de ese modo el límite de solubilidad en bebida de pH 3,4 es de aproximadamente 20 ppm. Las muestras que demuestran crecimiento se diferencian de las muestras libres de crecimiento después de 16 semanas por puntos negros frente a blancos respectivamente.

EJEMPLO 1

- 15 La pimaricina presenta un límite de solubilidad en agua de aproximadamente 52 ppm según informes en la bibliografía. Normalmente, los ácidos orgánicos son menos solubles a pH inferior, reflejando el impacto de la protonación de diversos grupos ácido carboxílico. La presencia de un grupo carboxílico en el carbono 24 en la estructura principal de carbono de la pimaricina debe disminuir, de manera predecible, la solubilidad de la pimaricina todavía adicionalmente cuando la pimaricina está presente en un entorno ácido. Estos factores son consecuentes con los hallazgos de que el límite de solubilidad de la pimaricina en bebida de base acuosa con alto contenido en ácido es de aproximadamente 20 ppm a temperatura ambiental (25°C) y de 10 ppm en la misma bebida a 4°C. El siguiente ejemplo proporciona una ilustración de la incapacidad de la pimaricina para impedir el deterioro cuando la concentración de pimaricina está restringida a su límite natural de solubilidad (concentración independiente).
- 20
- 25 Se formó una bebida no carbonatada a base de zumo de fruta al 2% de pH 3,4 y aproximadamente 12 grados Brix combinando los siguientes ingredientes.

Agua añadida	Aproximadamente el 84% de agua
Concentrado de zumo de manzana	Aproximadamente el 0,372% para proporcionar una concentración de una única riqueza de aproximadamente el 2%
Sacarosa	6,8%
Glucosa	5,2%
Fructosa	0,2%
Pimaricina	0-0,002% (concentración final)
Ácido málico	0,134 %
Malato de sodio	0,013% (aproximadamente, ajustar el pH a 3,4)
CaCl ₂ -2H ₂ O	0,011%
MgCl ₂ -6H ₂ O	0,003%

- 30 Se dividió la preparación de bebida en dos alícuotas. A una alícuota se le añadió pimaricina (el 0,003% o 30 ppm). Se agitó la preparación que contenía pimaricina durante 24 horas a temperatura ambiente para garantizar una solubilidad máxima de la pimaricina. Después se filtró la preparación a través de un filtro de 0,22 micrómetros con el fin de eliminar la fracción de pimaricina que no entró en disolución. La concentración final de pimaricina se estableció espectrofotométricamente a 20,0 ppm.
- 35 La alícuota de bebida que contenía pimaricina y la preparación de bebida que carecía de pimaricina (también esterilizada por filtración) se mezclaron en diferentes razones de manera que se logró un intervalo de concentraciones de pimaricina que oscilaban entre 0 y 20,0 ppm. Cada una de las 24 preparaciones de este tipo se dividió entonces por igual a través de 8 tubos independientes para preparar 192 muestras. Entonces se inocularon por separado esporas de cada una de 7 especies de moho diferentes en tubos que contenían bebida de manera que cada moho se expusiera a crecer a lo largo de todo el intervalo de concentración de la pimaricina. A cada concentración de pimaricina, el 8º tubo de un conjunto servía como control negativo. Se sellaron los tubos de una manera que impedía la evaporación de humedad. Se incubaron entonces las muestras a 25°C durante un periodo de 16 semanas o hasta que todas las muestras de prueba presentaban evidencia visual de crecimiento de moho.
- 40
- 45 Las esporas de moho empleadas se obtuvieron de los siguientes organismos. Aislado de *Aspergillus niger* de Peps; cepa de la ATCC 90900 (*Talaromyces spectabilis*), cepa de la ATCC 48441 (*Penicillium galbrum*), ATCC 24088 (*Byssoschlamys fulva*), ATCC 96468 (*Neosartorya fischeri*) cepa de la ATCC 96463 (*Talaromyces flavus*) y cepa de la ATCC ATCC 10512 (*Talaromyces flavus* var. *flavus*). Cada tipo de espora estaba presente a 20 esporas por mililitro.

Tal como resulta evidente en la tabla 1, la mayoría de los mohos (>50%) podían crecer a la concentración más alta de pimaricina presente en disolución. Los resultados sugieren que la pimaricina a su límite natural de solubilidad demuestra un espectro de actividad bastante estrecho. En el presente documento, el término “espectro” se refiere al intervalo de tipos de organismo (género y especie) que presentan sensibilidad a la pimaricina. Pocas veces un antimicrobiano de espectro estrecho encuentra uso como conservante de alimentos o bebidas. Normalmente, es necesario que los compuestos antimicrobianos tengan un espectro relativamente ancho en su actividad con el fin de ser eficaces como conservante de alimentos o bebidas. En este caso, amplio espectro pretende significar que una sustancia es eficaz impidiendo el crecimiento de una fracción grande de manera medible de hongos de moho y levadura y que este punto se establece a través de pruebas de cepas, especies y géneros representativos.

En consecuencia, los resultados del estudio representados en la tabla 1 no apoyan el uso de pimaricina como conservante independiente para bebidas no carbonatadas.

15 Tabla 1

CIM para PIMARICINA no complejada				
Organismo	Cepa	Generación de esporas	T (C°) para la generación de esporas	CIM (ppm) de la incubación de 16 semanas
<i>Aspergillus</i>	Aislado de Pepsi	Dextrosa de patata	25	18,4
<i>Talaromyces spectabilis</i>	ATCC 90900	Dextrosa de patata	25	10,3
<i>Penicillium glabrum</i>	ATCC 48441	Dextrosa de patata	25	5,7
<i>Byssosclamyces fulva</i>	ATCC 10099	Dextrosa de patata	25	16,9
<i>Neosartorya fischeri</i>	ATCC 96468	Dextrosa de patata	25	>20
<i>Talaromyces flavus</i>	ATCC 96463	Dextrosa de patata	25	>20
<i>Talaromyces flavus var flavus</i>	ATCC 10512	Dextrosa de patata	25	>20

EJEMPLO 2

20 La pimaricina presenta un límite de solubilidad en agua de aproximadamente 20 ppm a temperatura ambiental (25°C) y de 10 ppm en la misma bebida a 4°C en una bebida con alto contenido en ácido de pH 3,4. Si fuera posible potenciar la solubilidad de pimaricina, es probable que la pimaricina inhibiera un intervalo más amplio de organismos que producen deterioro. En otras palabras, el espectro de pimaricina podría extenderse si la solubilidad de la pimaricina en disolución puede extenderse. El siguiente ejemplo proporciona una ilustración de un espectro más amplio de eficacia de la pimaricina cuando está presente en disolución más allá del límite normal de solubilidad en la fase acuosa. La concentración aumentada de pimaricina se logra a través de la complejación con ciclodextrinas. En este ejemplo particular, se emplea beta (β) ciclodextrina como molécula “hospedadora” para la molécula “huésped” de pimaricina. Durante la preparación del complejo de ciclodextrina con pimaricina, es probable que se formen varias razones diferentes de ciclodextrina:pimaricina. El complejo que predomina se entiende que es β-ciclodextrina:pimaricina 1:1. Se formó una bebida no carbonatada a base de zumo de fruta al 2% de pH 3,4 y aproximadamente 12 grados Brix combinando los siguientes ingredientes.

Agua añadida	Aproximadamente el 84% de agua
Concentrado de zumo de manzana	Aproximadamente el 0,372% para proporcionar una concentración de una única riqueza de aproximadamente el 2%
Sacarosa	6,8%
Glucosa	5,2%
Fructosa	0,2%
Pimaricina-β-CD	0 - 0,04% pimaricina (concentración final máxima)
Ácido málico	0,134 %
Malato de sodio	0,013% (aproximadamente, ajustar el pH a 3,4)

CaCl ₂ -2H ₂ O	0,011%
MgCl ₂ -6H ₂ O	0,003%

Se dividió la preparación de bebida en dos alícuotas. Se preparó una de las dos alícuotas para que contuviera 400 ppm de pimaricina (0,04%) por medio de un complejo de inclusión con β-ciclodextrina. El establecimiento de la concentración de pimaricina en disolución se logra fácilmente por medio de espectrofotometría de UV. (Esto no significa que el límite de solubilidad de la pimaricina en disolución con ciclodextrina sea de 400 ppm. Se obtienen fácilmente concentraciones en exceso de 1000 ppm con o bien β o bien γ ciclodextrina).

La segunda alícuota de bebida es idéntica a la 1ª alícuota excepto por la presencia de complejo de ciclodextrina-pimaricina. La alícuota de bebida que contiene pimaricina y la preparación de bebida que carece de pimaricina (también esterilizada por filtración) se mezclaron en diferentes razones de manera que se logró un intervalo de concentraciones de pimaricina que oscilaba entre 0 y 400,0 ppm. Cada una de las 36 preparaciones de este tipo se dividió entonces por igual a través de 8 tubos independientes para preparar 288 muestras. Entonces se inocularon por separado esporas de cada una de 7 especies de moho diferentes en tubos que contenían bebida de manera que cada moho se expusiera a crecer a lo largo de todo el intervalo de concentración de la pimaricina. A cada concentración de pimaricina, el 8º tubo de un conjunto servía como control negativo. Se sellaron los tubos de una manera que impedía la evaporación de humedad. Se incubaron entonces las muestras a 25°C durante un periodo de 16 semanas o hasta que todas las muestras presentaban evidencia visual de crecimiento de mohos.

Las esporas de moho empleadas se obtuvieron de los siguientes organismos. *Paecilomyces puntoni* (aislado de Pepsi D3), ATCC 36614 (*Byssochlamys nieva*) ATCC 24088 (*Byssochlamys fulva*), ATCC 96468 (*Neosartorya fischeri*) cepa de la ATCC 96463 (*Talaromyces flavus*) y cepa de la ATCC ATCC 10512 (*Talaromyces flavus* var. *flavus*). Cada tipo de espora estaba presente inicialmente a 20 esporas por mililitro de producto. Se desarrollaron esporas para *Byssochlamys nieva* a tanto 25°C sobre dextrosa de patata como a 30°C sobre extracto de malta con el fin de garantizar alguna variación en la razón de asci (ascosporas) con respecto a conidiosporas.

Tal como resulta evidente en la tabla 2, la gran mayoría de las especies de mohos bioindicadoras (~86%) no podían crecer a la concentración más alta de pimaricina presente en disolución (400 ppm). Los resultados indican claramente que pimaricina sola, cuando está presente a concentraciones en exceso de 200 ppm, puede ser adecuada para permitir la producción comercial de muchos productos de bebidas. En muchos casos, concentraciones de tan sólo 50 a 100 ppm de pimaricina podrían ser suficientes si la expectativa de vida útil de almacenamiento se mide en días frente a semanas tal como será el caso para determinadas formulaciones de dispensador. Debido a que casi cualquier tipo de producto se expone a temperaturas de refrigeración durante la distribución, el almacenamiento o la exposición, cualquier concentración de pimaricina por encima de 10-15 ppm se convierte en un problema a menos que el problema se evite por la inclusión de pimaricina en complejo con ciclodextrinas.

Tabla 2

Organismo	Designación de la cepa	Medio para desarrollar la cosecha de esporas	Temperatura de incubación (°C) durante la esporulación	CIM (ppm) de la incubación de 16 semanas
<i>Paecilomyces puntoni</i>	D3-Pepsi	Dextrosa de patata	25	18
<i>Byssochlamys nieva</i>	ATCC 36614	Dextrosa de patata	25	18
<i>Byssochlamys fulva</i>	ATCC 24088	Dextrosa de patata	25	18
<i>Byssochlamys fulva</i>	ATCC 24088	Extracto de malta	30	18
<i>Neosartorya fischeri</i>	ATCC 96468	Dextrosa de patata	25	32
<i>Talaromyces flavus</i>	ATCC 96463	Dextrosa de patata	25	400
<i>Talaromyces flavus</i> var. <i>flavus</i>	ATCC 10512	Dextrosa de patata	25	39

La tolerancia de *Talaromyces flavus* a la pimaricina no es particularmente sorprendente. La pimaricina se clasifica como un polieno y se ha notificado que varias especies de mohos patógenas son tolerantes o resistentes a sustancias antifúngicas de polieno que se emplean comúnmente en aplicaciones médicas (anfotericina B). Aparentemente, algunos organismos fúngicos pueden reducir la cantidad de ergosterol que está presente en la membrana cuando se confrontan con pimaricina o polienos estructurados de manera similar. Al hacer esto, el organismo reduce la oportunidad para que la pimaricina interaccione o se una a ergosterol; una primera etapa necesaria en el modo de acción (MOA) de la pimaricina. Un mecanismo de este tipo no es resistencia sino en su

lugar tolerancia porque los genes requeridos para la tolerancia no se transmiten fácilmente a través de la especie o el género. También debe indicarse que los organismos que presentaban una sensibilidad relativamente baja a la pimaricina en ausencia de un complejo con ciclodextrina parecen igual de sensibles a la forma de pimaricina presente en el complejo con ciclodextrina. Este resultado es inesperado porque era posible que el complejo no liberara pimaricina a la célula si la constante de unión entre pimaricina y la ciclodextrina excedía de manera medible la constante de unión de pimaricina a su biomolécula hospedadora presente en la envuelta celular de los hongos.

EJEMPLO 3

El hecho de que uno o más mohos bioindicadores demuestren tolerancia a la pimaricina a lo largo de un periodo de 16 semanas no excluye la posibilidad de emplear complejo de ciclodextrina-pimaricina conservante independiente. Al mismo tiempo, si se identifican otras sustancias que proporcionan un efecto antimicrobiano aditivo a la pimaricina, entonces existirá la opción de proporcionar una garantía adicional de estabilidad del producto durante tanto como 16 semanas. Para este fin, se sometió a prueba ciclodextrina en complejo con pimaricina en combinación con otros agentes químicos para establecer si tales combinaciones eran más eficaces que la pimaricina sola.

Se preparó una bebida a base de zumo de manzana para que contuviera 30 ppm de EDTA (0,003%) tal como se muestra a continuación. Se dividió la bebida en dos alícuotas. Se suplementó una alícuota con pimaricina en complejo con β-ciclodextrina para lograr una concentración de pimaricina final de 400 ppm. Tal como se describió anteriormente, se mezclaron las porciones de dos alícuotas en diversas razones para lograr un intervalo de concentraciones de pimaricina de 0 a 400 ppm. Se distribuyeron las preparaciones de pimaricina a tubos separados permitiendo la exposición de cada uno de 7 mohos bioindicadores diferentes a cada concentración de pimaricina preparada.

Agua añadida	Aproximadamente el 84% de agua
Concentrado de zumo de manzana	Aproximadamente el 0,372% para proporcionar una concentración de una única riqueza de aproximadamente el 2%
Sacarosa	6,8%
Glucosa	5,2%
Fructosa	0,2%
Pimaricina (en complejo con β-ciclodextrina)	0 - 0,04% (concentración final máxima)
Ácido málico	0,134 %
Malato de sodio	0,013% (aproximadamente, ajustar el pH a 3,4)
CaCl ₂ -2H ₂ O	0,011%
MgCl ₂ -6H ₂ O	0,003%
EDTA	0,003%

Los resultados del estudio (tabla 3) son algo sorprendentes porque ninguno de los mohos bioindicadores creció en presencia de 30 ppm de EDTA y pimaricina cuando la concentración de pimaricina era de al menos 160 ppm.

Tabla 3

Organismo	Designación de la cepa	Medio para desarrollar la cosecha de esporas	Temperatura de incubación (°C) durante la esporulación	CIM (ppm) de la incubación de 16 semanas
<i>Paecilomyces puntoni</i>	D3-Pepsi	Dextrosa de patata	25	11
<i>Byssochlamys nieva</i>	ATCC 36614	Dextrosa de patata	25	11
<i>Byssochlamys fulva</i>	ATCC 24088	Dextrosa de patata	25	11
<i>Byssochlamys fulva</i>	ATCC 24088	Extracto de malta	30	11
<i>Neosartorya fischeri</i>	ATCC 96468	Dextrosa de patata	25	24
<i>Talaromyces flavus</i>	ATCC 96463	Dextrosa de patata	25	<160
<i>Talaromyces flavus var flavus</i>	ATCC 10512	Dextrosa de patata	25	28

5 Aunque la presencia de EDTA es aditiva de alguna manera para la acción de ácido benzoico y sórbico, no se entiende generalmente que el EDTA presente una actividad antifúngica medible por sí misma ni se entiende generalmente que tenga una acción ampliamente aditiva con todas las sustancias antimicrobianas. De hecho, se emplea a menudo EDTA como suplemento para el medio de crecimiento microbiano para garantizar la disponibilidad de determinados cationes. Sin querer restringirse a la teoría, parece que el efecto de EDTA en presencia de pimarcina puede ser algo distinto de simplemente secuestrar cationes divalentes.

10 Las esporas de moho empleadas se obtuvieron de los siguientes organismos. *Paecilomyces puntonii*, aislado de (D3) Pepsi; ATCC 36614 *Byssochlamys nieva*, ATCC 24088 (*Byssochlamys fulva*), ATCC 96468 (*Neosartorya fischeri*) cepa de la ATCC 96463 (*Talaromyces flavus*) y cepa de la ATCC ATCC 10512 (*Talaromyces flavus* var. *flavus*) cepa de la ATCC 90900. Cada tipo de espora estaba presente, inicialmente, a aproximadamente 20 esporas por mililitro.

15 EJEMPLO 4

Los resultados del ejemplo 3 fueron favorables de manera medible y aunque la interacción exacta entre EDTA y pimarcina no está clara, parecía razonable anticipar que la pimarcina en combinación con dos o más secuestrantes podría también producir resultados favorables. Para este fin, se formuló una bebida para que contuviera tanto 30 ppm de EDTA como 750 ppm de hexametáfosfato de sodio. Como en el caso del ejemplo anterior, se dividió la bebida preparada en dos alícuotas. A una de las alícuotas se le añadió pimarcina en complejo con β -ciclodextrina de manera que la concentración final de pimarcina es de 400 ppm (0,04%).

Ingrediente	% de composición
Agua	92
Concentrado de zumo de manzana	El 0,372% de concentrado para proporcionar una concentración de una única riqueza de aproximadamente el 2%
Sacarosa	6,8
Glucosa	5,2
Fructosa	0,2
Pimarcina- β -ciclodextrina	0 - 0,04% (como pimarcina)
Ácido málico	0,134%
Malato de sodio	0,013%
CaCl ₂ -2H ₂ O	0,011%
MgCl ₂ -6H ₂ O	0,003%
EDTA	0,003%
Hexametáfosfato de sodio	0,075%

25 Entonces se mezclaron las dos alícuotas en diferentes razones con el fin de obtener 24 preparaciones de bebida independientes que presentaban conjuntamente un intervalo de concentraciones de pimarcina de 0 a 400 ppm. 11 ppm de pimarcina es la concentración más baja de la prueba de pimarcina. El volumen de la bebida de cada concentración particular de pimarcina se subdividió entre 8 recipientes y se inocularon siete recipientes a cada concentración de pimarcina con un hongo de moho bioindicador independiente. Una muestra permaneció sin
30 inocular y sirvió como control negativo. Cada molde se inoculó por separado en volúmenes de muestra que carecían de pimarcina pero presentaban EDTA y SHMP. Estas muestras sirvieron como controles positivos en esta prueba. Se mantuvieron las muestras a 25°C durante un periodo de 16 semanas antes de la evaluación final de CIM notificada mostrada en la tabla 4.

35 Tabla 4

Organismo	Designación de la cepa	Medio para desarrollar la cosecha de esporas	Temperatura de incubación (°C) durante la esporulación	CIM (ppm) de la incubación de 16 semanas
<i>Paecilomyces puntoni</i>	D3-Pepsi	Dextrosa de patata	25	12
<i>Byssochlamys nieva</i>	ATCC 36614	Dextrosa de patata	25	13,7
<i>Byssochlamys fulva</i>	ATCC 24088	Dextrosa de patata	25	11

<i>Byssochlamys fulva</i>	ATCC 24088	Extracto de malta	30	11
<i>Neosartorya fischeri</i>	ATCC 96468	Dextrosa de patata	25	13,7
<i>Talaromyces flavus</i>	ATCC 96463	Dextrosa de patata	25	66,7
<i>Talaromyces flavus var flavus</i>	ATCC 10512	Dextrosa de patata	25	23,6

Tal como resulta evidente a partir de la tabla 4, SHMP y EDTA se combinan para disminuir el valor de CIM observado de la pimaricina para al menos una de las cepas bioindicadoras. Igualmente importante, la presencia de estas sustancias no interfiere con la actividad de la pimaricina unida a β -ciclodextrina. SHMP y EDTA no sólo sirven como conservantes adjuntos, sino que también funcionan estabilizando vitaminas o colores naturales frente a la degradación oxidativa. El hecho de que la pimaricina, cuando está presente con EDTA y SHMP, sea eficaz a una concentración de 66 ppm es importante porque permite que la pimaricina esté presente (como huésped en un complejo de ciclodextrina) como componente del concentrado de bebida. Por ejemplo, un concentrado se diluye frecuentemente mediante una dilución de 1 a 5 con agua de proceso. Si estaba presente pimaricina en el concentrado a 400 ppm de pimaricina, entonces la concentración en la bebida procesada (final) que es de 66,7 de complejo de β -ciclodextrina con pimaricina tendría que añadirse por separado tras el procesamiento del concentrado con agua. La necesidad de hacer una adición de este tipo en el sitio de fabricación puede ser motivo de preocupación.

Las esporas de moho empleadas se obtuvieron de los siguientes organismos. *Paecilomyces puntonii*, aislado (D3) de Pepsi; ATCC 36614 *Byssochlamys nieva*, ATCC 24088 (*Byssochlamys fulva*), ATCC 96468 (*Neosartorya fischeri*) cepa de la ATCC 96463 (*Talaromyces flavus*) y cepa de la ATCC ATCC 10512 (*Talaromyces flavus var. flavus*) cepa de la ATCC 90900. Cada tipo de spora estaba presente, inicialmente, a aproximadamente 20 esporas por mililitro.

20 EJEMPLO 5

Se evaluó la eficacia del complejo de pimaricina a lo largo de un intervalo de pH. La pimaricina presenta un único grupo ácido carboxílico que presenta supuestamente una pK_a en el intervalo de 6,5. En consecuencia, el resto ácido carboxílico está en forma protonada a pH de y por debajo de 5,5. Entre pH 5,5 y pH 6,5 el grado de protonación descende desde casi el 100% hasta aproximadamente el 50%. Puesto que el impacto del pH sobre la solubilidad no está en juego en este caso (debido al complejo con ciclodextrina), cualquier diferencia observada en la actividad entre pH 3 y pH 6,0 es probable que sea la consecuencia de factores distintos del estado de protonación de la pimaricina. Por ejemplo, un cambio en la composición de la membrana lipídica de organismos que producen deterioro en función del pH puede provocar que sean o bien más o bien menos tolerantes a la pimaricina. Dependiendo de la naturaleza de la formulación de bebida, es también posible que o bien pimaricina o bien el complejo interaccionen de manera favorable o desfavorable con ingredientes tales como pectina o edulcorantes artificiales.

A continuación está la fórmula para una bebida de té a pH 5,5 en la que puede añadirse pimaricina como conservante independiente o en combinación con conservantes adjuntos tales como ácido cinámico. Obsérvese que el edulcorante es sacarosa en este ejemplo particular. Está presente pectina como sustancia candidata que podría interaccionar con el complejo de pimaricina y β -ciclodextrina. Similar al protocolo en otros ejemplos, se prepararon dos lotes de producto conteniendo uno pimaricina en complejo con β -ciclodextrina y el segundo lote libre de pimaricina. El mezclado de las dos preparaciones en diferentes razones permitió las pruebas de 36 concentraciones diferentes de pimaricina en el intervalo de 0-400 ppm de pimaricina.

Ingrediente	% de composición
Agua añadida	Aproximadamente 93
Sacarosa natural	6,3
Gránulos de miel	0,05
Sólido de té verde	0,1332
Aroma a cítrico	0,002
Aroma a té verde	0,2046
Pectina de baja opacidad	0,017
Ácido cítrico	0,055
Vitamina C seca de acerola	0,055
CaCl ₂ -2H ₂ O	0,0039

MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,0027
Ácido succínico	0,135
Succinato de Na ⁺	0,028
Complejo de β-CD-pimaricina	como pimaricina = 0-0,04

La tabla 5 a continuación incorpora los resultados de prueba que establecen la concentración inhibitoria mínima (CIM) a las 16 semanas de pimaricina para cepas bioindicadoras de moho en la fórmula de bebida de té del ejemplo 5. El impacto del pH 5,5 sobre la actividad de la pimaricina en complejo con β-ciclodextrina es mínimo, y quizá ligeramente favorable, en relación con los resultados de prueba con bebidas de pH inferior. Además, los resultados no indican ninguna interacción desfavorable con los ingredientes de la bebida de té incluyendo pectina y sólidos de té. Parece estar en juego un patrón en el que algunas especies son tolerantes de manera medible a la pimaricina en relación con el grupo de bioindicadores en su totalidad. Tal como se sugirió anteriormente, algunos tipos de moho pueden ser capaces de impedir los efectos de la pimaricina a través de uno o más mecanismos bioquímicos que no se comparten ampliamente entre todos los géneros de especies de moho.

La ausencia de interacciones entre β-ciclodextrina en complejo con pimaricina y otros ingredientes puede parecer un factor menos que relevante. Sin embargo, es necesario entender que la ausencia de interacción entre conservantes tradicionales e ingredientes de bebida es una cuestión importante de manera medible. En gran medida debido a las interacciones químicas entre ácido benzoico, ácido ascórbico y EDTA, es por lo que es imperativo el descubrimiento de nuevos conservantes. El ácido sórbico es también susceptible a degradación en presencia de ácido ascórbico. Además, muchos de los conservantes recién identificados tales como ε-polilisina y arginato láurico son por sí mismos reactivos con diversos ingredientes de formulación.

20 Tabla 5

Organismo	Designación de la cepa	Medio para desarrollar la cosecha de esporas	Temperatura de incubación (°C) durante la esporulación	CIM (ppm) de la incubación de 16 semanas
<i>Paecilomyces puntonii</i>	D3-Pepsi	Dextrosa de patata	25	18
<i>Paecilomyces variotii</i>	D16-Pepsi	Dextrosa de patata	25	12
<i>Byssoschlamys fulva</i>	ATCC 24088	Dextrosa de patata	25	12
<i>Byssoschlamys fulva</i>	ATCC 24088	Extracto de malta	30	25
<i>Neosartorya fischeri</i>	ATCC 96468	Dextrosa de patata	25	52
<i>Talaromyces flavus</i>	ATCC 96463	Dextrosa de patata	25	255
<i>Talaromyces flavus var flavus</i>	ATCC 10512	Dextrosa de patata	25	74

Las esporas de moho empleadas se obtuvieron de los siguientes organismos. *Paecilomyces puntonii*, aislado (D3) de Pepsi; ATCC 36614 *Byssoschlamys nieva*, ATCC 24088 (*Byssoschlamys fulva*), ATCC 96468 (*Neosartorya fischeri*) cepa de la ATCC 96463 (*Talaromyces flavus*) y cepa de la ATCC ATCC 10512 (*Talaromyces flavus var. flavus*) cepa de la ATCC 90900. Cada tipo de espora estaba presente, inicialmente, a aproximadamente 20 esporas por mililitro.

EJEMPLO 6

Tal como se mencionó anteriormente, la pimaricina en complejo con ciclodextrina puede interactuar positivamente con productos químicos y agentes conservantes adjuntos. El ejemplo 3 indica la existencia de una interacción aditiva entre EDTA y pimaricina incluida en β-ciclodextrina en una bebida de zumo de manzana de pH 3,4. El ejemplo 4 desarrolla la interacción que existe entre pimaricina, EDTA y SHMP a pH 3,4. En este caso, en el ejemplo 6, el intervalo de pH en el que se encuentra que tales interacciones son posibles se extiende hasta un pH de 5,5. Específicamente, la interacción entre pimaricina en complejo con β-ciclodextrina y ácido etilendiaminasuccínico (EDDS) a pH 5,5. EDDS, como EDTA, es un secuestrante. Sin embargo, EDDS se supone que se produce de manera natural en una gama de microorganismos y plancton. Como tal, puede obtenerse EDDS como una sustancia natural y puede combinarse con pimaricina y ciclodextrina para proporcionar un sistema de conservación completamente natural.

A continuación está la fórmula para una bebida de té a pH 5,5 que contiene 30 ppm de EDDS. La adición de pimaricina en complejo con β-ciclodextrina permite la posibilidad de una interacción entre EDDS y pimaricina. El edulcorante es sacarosa en este ejemplo particular. Está presente pectina como sustancia candidata que podría

interaccionar con el complejo de pimaricina- β -ciclodextrina o EDDS.

Ingrediente	% de composición
Agua añadida	Aproximadamente 93
Sacarosa natural	6,3 (cuando está presente)
Gránulos de miel	0,05
Sólido de té verde	0,1332
Aroma a cítrico	0,002
Aroma a té verde	0,2046
Pectina de baja opacidad	0,017
Ácido cítrico	0,055
Vitamina C seca de acerola	0,055
CaCl ₂ -2H ₂ O	0,0039
MgCl ₂ -6H ₂ O	0,0027
Ácido succínico	0,135
Succinato de Na ⁺	0,028
Succinato de etilendiamina	0,003

- 5 Similar al protocolo en otros ejemplos, se prepararon dos lotes de producto conteniendo uno pimaricina en complejo con β -ciclodextrina y el segundo lote libre de pimaricina. Ambas preparaciones contienen 30 ppm de EDDS. El mezclado de las dos preparaciones en diferentes razones permitió las pruebas de 36 concentraciones diferentes de pimaricina en el intervalo de 0-400 ppm de pimaricina en las que la concentración de EDDS se mantiene estacionaria a 30 ppm.
- 10 La tabla 6 incorpora los resultados de prueba que establecen la concentración inhibitoria mínima (CIM) a las 16 semanas de pimaricina para cepas bioindicadoras de moho en la fórmula de bebida de té del ejemplo 6 en la que la interacción entre EDDS y pimaricina es de interés. La actividad de EDDS, como EDTA, es ligeramente sensible al pH y cualquiera de estas sustancias debe unirse a cationes más eficazmente con un aumento en el pH desde 2,0 hasta 7,0. La disponibilidad reducida de cationes para organismos que producen deterioro puede debilitar su tolerancia a conservantes tales como pimaricina. Por ejemplo, la disponibilidad reducida de Ca⁺⁺ reduce probablemente la integridad de la envuelta celular. Se cree que Ca⁺⁺ reticula grupos de cabeza cargados negativamente de diversos fosfolípidos en la membrana. Al hacer esto, Ca⁺⁺ reticula fosfolípidos limitando eficazmente el acceso a la membrana. Con la integridad de la envuelta celular disminuida por la acción de EDDS sobre la disponibilidad de Ca⁺⁺ en el organismo que produce deterioro, la pimaricina puede obtener acceso más fácilmente a su objetivo en la membrana celular. También podrían estar en juego otras interacciones entre cationes metálicos y determinados tipos de secuestrantes.
- 15
- 20

Tabla 6

Organismo	Designación de la cepa	Medio para desarrollar la cosecha de esporas	temperatura de incubación (°C) durante la esporulación	CIM (ppm) de la incubación de 16 semanas
<i>Paecilomyces puntoni</i>	D3-Pepsi	Dextrosa de patata	25	12
<i>Paecilomyces variotii</i>	D16-Pepsi	Dextrosa de patata	25	12
<i>Byssochlamys fulva</i>	ATCC 24088	Dextrosa de patata	25	12
<i>Byssochlamys fulva</i>	ATCC 24088	Extracto de malta	30	25
<i>Neosartoryafischeri</i>	ATCC 96468	Dextrosa de patata	25	34
<i>Talaromyces flavus</i>	ATCC 96463	Dextrosa de patata	25	155
<i>Talaromyces flavus</i> var <i>flavus</i>	ATCC 10512	Dextrosa de patata	25	45

- 25 En este caso, como en el ejemplo 5, el impacto del pH 5,5 sobre la actividad de la pimaricina en complejo con β -

ciclodextrina es mínimo, y quizá ligeramente favorable, en relación con resultados de prueba con bebidas de pH inferior. Además, los resultados no indican ninguna interacción desfavorable con ingredientes de la bebida de té incluyendo pectina y sólidos de té. Finalmente, la concentración de pimaricina, en presencia de EDDS, requerida para inhibir el crecimiento de hongos que producen deterioro es menor de manera medible cuando está ausente EDDS. O bien EDDS o bien EDTA solos pueden al menos ralentizar el desarrollo de hongos por sí mismos, de modo que la interacción entre EDDS y pimaricina es probablemente al menos aditiva.

Las esporas de moho empleadas se obtuvieron de los siguientes organismos. *Paecilomyces puntonii*, aislado (D3) de Pepsi; ATCC 36614 *Byssochlamys nieva*, ATCC 24088 (*Byssochlamys fulva*), ATCC 96468 (*Neosartorya fischeri*) cepa de la ATCC 96463 (*Talaromyces flavus*) y cepa de la ATCC ATCC 10512 (*Talaromyces flavus* var. *flavus*) cepa de la ATCC 90900. Cada tipo de espora estaba presente, inicialmente, a aproximadamente 20 esporas por mililitro.

EJEMPLO 7

Los ejemplos 2-6 demuestran claramente que la pimaricina en complejo con ciclodextrina puede interactuar positivamente con productos químicos y agentes conservantes adjuntos en presencia de edulcorantes convencionales o naturales tales como sacarosa, fructosa y glucosa. Este ejemplo explora si se producen interacciones entre pimaricina, cuando está en complejo con β ciclodextrina, y los edulcorantes sintéticos bajos en calorías aspartamo y acesulfamo-K+. Para este fin, se preparó una bebida de té tal como se muestra a continuación. Se preparó la bebida para que tuviera un pH de 5,5. Se prepararon dos alícuotas de la bebida de té, una con y otra sin 400 ppm de pimaricina en complejo con β -ciclodextrina. Se prepararon muestras de prueba individuales con concentración variable de pimaricina mezclando diferentes proporciones de bebida con y sin la pimaricina complejada. De este modo, se evaluaron 36 concentraciones diferentes de pimaricina entre el intervalo de 0 y 400 ppm.

Ingrediente	% de composición
Agua añadida	Aproximadamente 97
Aspartamo	0,105
Gránulos de miel	0,05
Aspartamo K+	0,0599
Sólido de té verde	0,1332
Aroma a cítrico	0,002
Aroma a té verde	0,2046
Pectina de baja opacidad	0,017
Ácido cítrico	0,055
Vitamina C seca de acerola	0,055
CaCl ₂ -2H ₂ O	0,0039
MgCl ₂ -6H ₂ O	0,0027
Ácido succínico	0,135
Succinato de Na+	0,028

Los datos de la prueba se capturan en la tabla 7. Como siempre, una fracción de moho bioindicador demostró un grado de sensibilidad a la pimaricina que es afín a la observada para levadura. Una fracción de los mohos bioindicadores era sensible a la pimaricina sólo a concentraciones que excedían el límite de solubilidad de la pimaricina cuando no estaba presente como un complejo. Tal como se indicó anteriormente, las diferencias en la tolerancia a la pimaricina no eran completamente inesperadas. Parece que el contenido en nutrientes inferior de una bebida fortificada con edulcorante bajo en calorías no confiere un entorno desfavorable con respecto a la eficacia de la pimaricina.

Tabla 7

Organismo	Designación de la cepa	Medio para desarrollar la cosecha de esporas	temperatura de incubación (°C) durante la esporulación	CIM (ppm) de la incubación de 16 semanas
<i>Paecilomyces puntoni</i>	D3-Pepsi	Dextrosa de patata	25	12

Organismo	Designación de la cepa	Medio para desarrollar la cosecha de esporas	temperatura de incubación (°C) durante la esporulación	CIM (ppm) de la incubación de 16 semanas
<i>Paecilomyces variotii</i>	D16-Pepsi	Dextrosa de patata	25	12
<i>Byssochlamys fulva</i>	ATCC 24088	Dextrosa de patata	25	12
<i>Byssochlamys fulva</i>	ATCC 24088	Extracto de malta	30	12
<i>Neosartorya fischeri</i>	A TCC 96468	Dextrosa de patata	25	34
<i>Talaromyces flavus</i>	ATCC 96463	Dextrosa de patata	25	139
<i>Talaromyces flavus</i> var <i>flavus</i>	ATCC 10512	Dextrosa de patata	25	45

Las esporas de moho empleadas se obtuvieron de los siguientes organismos. *Paecilomyces puntonii*, aislado (D3) de Pepsi; ATCC 36614 *Byssochlamys nieva*, ATCC 24088 (*Byssochlamys fulva*), ATCC 96468 (*Neosartorya fischeri*) cepa de la ATCC 96463 (*Talaromyces flavus*) y cepa de la ATCC ATCC 10512 (*Talaromyces flavus* var. *flavus* cepa de la ATCC 90900. Cada tipo de espora estaba presente, inicialmente, a aproximadamente 20 esporas por mililitro.

EJEMPLO 8

Se formuló una bebida “buena para usted” (nutracéutica) a un pH de 3,6. De manera importante, la bebida contiene goma xantana. La sacarosa es el edulcorante en este caso. (El ejemplo 9 sustituye sacarosa por rebaudiósido A). Esta formulación presenta otra oportunidad para establecer que el complejo de ciclodextrina y pimaricina no interacciona de manera negativa con ingredientes de una bebida tal como gomas y coloides. A la bebida se le añade pimaricina en forma de un complejo con gamma (γ)-ciclodextrina. La γ -ciclodextrina es mayor que la β -ciclodextrina (PM de 1295 frente a 1134) y presenta una cavidad ligeramente mayor (el diámetro de abertura máximo es de 0,88 nm frente a 0,7 nm). En cualquier caso, la cavidad no es lo suficientemente grande como para abarcar la totalidad de una molécula de pimaricina. Lo más probable es que la porción no polar de la pimaricina sobresalga hacia abajo dentro de la cavidad mientras que el extremo del área polar (grupo carboxilo + amino) sobresalga por encima del borde de la cavidad. De manera interesante, al extremo no polar de la molécula se le calcula una anchura de aproximadamente 0,63 nm (radios de van der Waal + longitud de enlace calc.). Si es exacta, la pimaricina debe ajustarse fácilmente dentro de la cavidad de (γ)-ciclodextrina mientras que el ajuste con β -ciclodextrina será bastante estrecho. (A 0,56 nm de anchura de abertura máxima, no es probable que la alfa ciclodextrina aloje pimaricina en una relación de huésped-hospedador de 1:1).

Tal como se realiza en todos los ejemplos, se produjeron dos alícuotas de bebida, una que contenía complejo de (γ)-ciclodextrina-pimaricina de manera que se logró una concentración final de 400 ppm de pimaricina. La combinación de las dos alícuotas en diferentes proporciones permitió la generación de 36 concentraciones diferentes de pimaricina que oscilaban entre 0-400 ppm. Tras la inoculación con esporas de diversos mohos, se incubaron las muestras a 25-27°C durante un periodo de 16 semanas antes de establecerse la CIM (CIM = concentración inhibitoria mínima requerida para impedir el desarrollo de mohos durante un periodo de 16 semanas).

Ingrediente	% de composición
Agua añadida	Aproximadamente 93
Sacarosa	6,8
Citrato de K+	0,025
Vitamina NutraBlend/aroma	0,025
Lactato de calcio	0,025
Aroma (uva)	0,025
Goma xantana	0,030
Ácido ascórbico	0,050
Ácido cítrico Anyd	0,067
Color	0,100
Aroma a Yang Mei - granada	0,100
Eritritol	2,490

Ingrediente	% de composición
Pimaricina en complejo con α -ciclodextrina	0 - 0,040
CaCl ₂ -2H ₂ O	0,0039
MgCl ₂ -6H ₂ O	0,0027

Los datos de CIM para este ejemplo se capturan en la tabla 8. El patrón insiste en que determinados mohos son tolerantes a la pimaricina a concentraciones por encima del límite natural de solubilidad de la pimaricina pero que la pimaricina complejada puede contener el crecimiento de incluso las formas más agresivamente tolerantes de moho. También parece que la concentración requerida de pimaricina puede ser específica de la bebida.

Tabla 8

Organismo	Designación de la cepa	Medio para desarrollar la cosecha de esporas	Temperatura de incubación (°C) durante la esporulación	CIM (ppm) de la incubación de 16 semanas
<i>Paecilomyces puntoni</i>	D3-Pepsi	Dextrosa de patata	25	12
<i>Paecilomyces variotii</i>	D16-Pepsi	Dextrosa de patata	25	60
<i>Byssochlamys fulva</i>	ATCC 24088	Dextrosa de patata	25	12
<i>Byssochlamys fulva</i>	ATCC 24088	Extracto de malta	30	12
<i>Neosartorya fischeri</i>	ATCC 96468	Dextrosa de patata	25	34
<i>Talaromyces flavus</i>	ATCC 96463	Dextrosa de patata	25	278
<i>Talaromyces flavus var flavus</i>	ATCC 10512	Dextrosa de patata	25	45

Las esporas de moho empleadas se obtuvieron de los siguientes organismos. *Paecilomyces puntonii*, aislado (D3) de Pepsi; ATCC 36614 *Byssochlamys nieva*, ATCC 24088 (*Byssochlamys fulva*), ATCC 96468 (*Neosartorya fischeri*) cepa de la ATCC 96463 (*Talaromyces flavus*) y cepa de la ATCC ATCC 10512 (*Talaromyces flavus var. flavus* cepa de la ATCC 90900. Cada tipo de espора estaba presente, inicialmente, a aproximadamente 20 esporas por mililitro.

EJEMPLO 9

Se formuló una bebida "buena para usted" (nutracéutica) a un pH de 3,6. De manera importante, la bebida contiene goma xantana y el edulcorante natural bajo en calorías conocido como rebaudiósido A. Esta formulación presenta otra oportunidad para establecer que el complejo de ciclodextrina y pimaricina no interacciona de una manera negativa con los ingredientes de una bebida. A la bebida se le añade pimaricina en forma de un complejo con gamma (γ)-ciclodextrina. La γ -ciclodextrina es mayor que la β -ciclodextrina (PM de 1295 frente a 1134) y presenta una cavidad ligeramente mayor (el diámetro de abertura máximo es de 0,88 nm frente a 0,7 nm). En cualquier caso, la cavidad no es lo suficientemente grande como para abarcar la totalidad de una molécula de pimaricina. Lo más probable es que la porción no polar de la pimaricina sobresalga hacia abajo dentro de la cavidad mientras que el extremo del área polar (grupo carboxilo + amino) sobresalga por encima del borde de la cavidad. De manera interesante, al extremo no polar de la molécula se le calcula una anchura de aproximadamente 0,63 nm (radios de van der Waal + longitud de enlace calc.). Si es exacta, la pimaricina debe ajustarse fácilmente dentro de la cavidad de (γ)-ciclodextrina mientras que el ajuste con β -ciclodextrina será bastante estrecho. (A 0,56 nm de anchura de abertura máxima, no es probable que la alfa ciclodextrina aloje pimaricina en una relación de huésped-hospedador de 1:1).

Tal como se realiza en todos ejemplos, se produjeron dos alícuotas de bebida, una que contenía complejo de (γ)-ciclodextrina-pimaricina de manera que se logró una concentración final de 400 ppm de pimaricina. La combinación de las dos alícuotas en diferentes proporciones permitió la generación de 36 concentraciones diferentes de pimaricina que oscilaban entre 0-400 ppm. Tras la inoculación con esporas de diversos mohos, se incubaron las muestras a 25-27°C durante un periodo de 16 semanas antes de establecerse la CIM (CIM = concentración inhibitoria mínima requerida para impedir el desarrollo de mohos durante un periodo de 16 semanas).

Ingrediente	% de composición
Agua añadida	Aproximadamente 97
Rebaudiósido A	0,021

Citrato de K+	0,025
Vitamina NutraBlend/aroma	0,025
Lactato de calcio	0,025
Aroma (uva)	0,025
Goma xantana	0,030
Ácido ascórbico	0,050
Ácido cítrico Anyd	0,067
Color	0,100
Aroma a Yang Mei - granada	0,100
Eritritol	2,490
Pimaricina en complejo con γ ciclodextrina	0 - 0,040
CaCl ₂ -2H ₂ O	0,0039
MgCl ₂ -6H ₂ O	0,0027

Los valores de CIM documentados se capturan en la tabla 9. Similar a otras pruebas, no hay evidencias de que la pimaricina interaccione de manera negativa con ingredientes de la bebida. Debe tenerse en cuenta que la actividad de algunas sustancias antimicrobianas puede verse comprometida por la interacción con componentes de bebidas.

- 5 En algunos casos, se forman complejos entre sustancias antimicrobianas y componentes de bebidas dando como resultado opacidad o precipitación. En otros casos, pueden producirse reacciones químicas entre ingredientes de bebidas y el antimicrobiano. Por ejemplo, el ácido sórbico es considerablemente menos estable en presencia de ácido ascórbico.
- 10 No hay tampoco ninguna indicación de que la liberación de pimaricina de γ -ciclodextrina se vea dificultada de manera medible en relación con pimaricina unida a β -ciclodextrina. En ambos casos, parece que la pimaricina se pierde fácilmente del complejo dentro de la membrana de organismos que producen deterioro cuando se presenta la oportunidad e independientemente de si la pimaricina está en complejo con β -ciclodextrina o γ -ciclodextrina. De hecho, la liberación de pimaricina de γ -ciclodextrina puede lograrse ligeramente más fácilmente dada la CIM
- 15 ligeramente inferior presentada con γ -ciclodextrina frente a β -ciclodextrina para *Talaromyces flavus*.

Las esporas de moho empleadas se obtuvieron de los siguientes organismos. *Paecilomyces puntonii*, aislado (D3) de Pepsi; ATCC 36614 *Byssochlamys nieva*, ATCC 24088 (*Byssochlamys fulva*), ATCC 96468 (*Neosartorya fischeri*) cepa de la ATCC 96463 (*Talaromyces flavus*) y cepa de la ATCC ATCC 10512 (*Talaromyces flavus* var. *flavus* cepa de la ATCC 90900. Cada tipo de espora estaba presente, inicialmente, a aproximadamente 20 esporas por mililitro.

- 20 de la ATCC 90900. Cada tipo de espora estaba presente, inicialmente, a aproximadamente 20 esporas por mililitro.

Tabla 9

Organismo	Designación de la cepa	Medio para desarrollar la cosecha de esporas	Temperatura de incubación (°C) durante la esporulación	CIM (ppm) de la incubación de 16 semanas
<i>Paecilomyces puntoni</i>	D3-Pepsi	Dextrosa de patata	25	12
<i>Paecilomyces variotii</i>	D16-Pepsi	Dextrosa de patata	25	54
<i>Byssochlamys fulva</i>	ATCC 24088	Dextrosa de patata	25	12
<i>Byssochlamys fulva</i>	ATCC 24088	Extracto de malta	30	12
<i>Neosartorya fischeri</i>	ATCC 96468	Dextrosa de patata	25	54
<i>Talaromyces flavus</i>	ATCC 96463	Dextrosa de patata	25	200
<i>Talaromyces flavus</i> var <i>flavus</i>	ATCC 10512	Dextrosa de patata	25	67

25 EJEMPLO 10 (no según la invención)

Era de interés establecer si la pimaricina podría interactuar de manera aditiva o sinérgica con sustancias antimicrobianas distintas de sequestrantes. Para este fin, se formuló una bebida nutracéutica para que contuviera la sustancia conservante natural, ácido cinámico (30 ppm). El ácido cinámico presenta actividad antimicrobiana pero el

5 impacto del ácido cinámico sobre los atributos sensoriales de las bebidas es desfavorable cuando el ácido cinámico está presente a una concentración muy por encima de 30 ppm (umbral sensorial). A 30 ppm, el ácido cinámico no es un conservante satisfactorio por sí mismo. De hecho, algunos organismos que producen deterioro pueden emplear ácido cinámico como nutriente cuando están presentes a concentraciones por debajo de 200-300 ppm. La demostración de un efecto aditivo o sinérgico entre ácido cinámico y pimaricina serviría para predecir interacciones similares entre pimaricina y otros compuestos conservantes estructurados de manera similar (parabenos, ácidos débiles (sorbico, benzoico)).

10 Tal como se explicó de manera resumida anteriormente, se formularon dos alícuotas de bebida independientes, una que contenía pimaricina en complejo con g-ciclodextrina y una sin. Ambas alícuotas contenían 30 ppm de ácido cinámico. Cuando se mezclaron las dos alícuotas en diferentes proporciones, se obtuvieron diferentes concentraciones de pimaricina pero la concentración de ácido cinámico es de 30 ppm en todas las muestras preparadas.

Ingrediente	% de composición
Agua añadida	Aproximadamente 97
Rebaudiósido A	0,021
Citrato de K+	0,025
Vitamina NutraBlend/aroma	0,025
Lactato de calcio	0,025
Aroma (uva)	0,025
Goma xantana	0,030
Ácido ascórbico	0,050
Ácido cítrico Anhyd	0,067
Color	0,100
Aroma a Yang Mei - granada	0,100
Eritritol	2,490
Ácido cinámico (como ácido)	0,003
Pimaricina en complejo con α -ciclodextrina	0 - 0,040
CaCl ₂ -2H ₂ O	0,0039
MgCl ₂ -6H ₂ O	0,0027

15 Las esporas de moho empleadas se obtuvieron de los siguientes organismos. *Paecilomyces puntonii*, aislado (D3) de Pepsi; ATCC 36614 *Byssoschlamys nieva*, ATCC 24088 (*Byssoschlamys fulvas*), ATCC 96468 (*Neosartorya fischeri*) cepa de la ATCC 96463 (*Talaromyces flavus*) y cepa de la ATCC ATCC 10512 (*Talaromyces flavus* var. *flavus* cepa de la ATCC 90900. Cada tipo de espora estaba presente, inicialmente, a aproximadamente 20 esporas por mililitro.

20 Tal como se evidencia mediante los resultados representados en la tabla 10, se encontró una disminución medible en los valores de CIM para algunos, pero no todos, los bioindicadores de moho cuando el ácido cinámico y la pimaricina actúan conjuntamente. Este resultado no pudo haberse predicho en ningún grado porque el mecanismo de acción mediante el cual funciona el ácido cinámico como antimicrobiano no se entiende bien. En consecuencia, estaba incluso en la gama de posibilidades que el ácido cinámico funcionara de manera antagonista en relación con la pimaricina. También es importante reconocer que los valores de CIM (16 semanas) de la pimaricina en presencia de ácido cinámico necesarios para conservar el producto frente al deterioro de una serie de mohos que producen deterioro están todavía por encima del límite de solubilidad de la pimaricina en ausencia de ciclodextrina (aproximadamente 52 ppm en agua en el ambiente y menor todavía en bebida con alto contenido en ácidos). El requisito disminuido de pimaricina cuando actúa conjuntamente con otras sustancias antimicrobianas permite el posible uso de pimaricina unida a α -ciclodextrina.

35 TABLA 10

Organismo	Designación de la cepa	Medio para desarrollar la cosecha de esporas	Temperatura de incubación (°C) durante la esporulación	CIM (ppm) de la incubación de 16 semanas
-----------	------------------------	--	--	--

ES 2 678 494 T3

<i>Paecilomyces puntoni</i>	D3-Pepsi	Dextrosa de patata	25	12
<i>Paecilomyces variotii</i>	D16-Pepsi	Dextrosa de patata	25	32
<i>Byssochlamys fulva</i>	ATCC 24088	Dextrosa de patata	25	12
<i>Byssochlamys fulva</i>	ATCC 24088	Extracto de malta	30	12
<i>Neosartorya fischeri</i>	ATCC 96468	Dextrosa de patata	25	34
<i>Talaromyces flavus</i>	ATCC 96463	Dextrosa de patata	25	126
<i>Talaromyces flavus</i> var <i>flavus</i>	ATCC 10512	Dextrosa de patata	25	34

Pueden hacerse diversos cambios y modificaciones sin apartarse del alcance de la invención, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Bebida que comprende:

5 un componente de bebida; y

un complejo de ciclodextrina-pimaricina;

10 en la que la bebida tiene un pH de 2,5 a 5,6; en la que la bebida cuando se coloca dentro de un recipiente sellado no se deteriora sustancialmente por microorganismos durante un periodo de al menos 16 semanas.
2. Bebida según la reivindicación 1, en la que la ciclodextrina se selecciona del grupo que consiste en [beta]-ciclodextrina, [alfa]-ciclodextrina, [gamma]-ciclodextrina, sulfobutil éter [beta]-ciclodextrina, hidroxipropil [beta]-ciclodextrina, [beta]-ciclodextrina metilada al azar y maltosil/dimaltosil [beta]-ciclodextrina, preferiblemente en la que la ciclodextrina se selecciona del grupo que consiste en [beta]-ciclodextrina y [gamma]-ciclodextrina.
3. Bebida según la reivindicación 1, en la que la pimaricina está presente en una cantidad de 25 mg/l a 400 mg/l, preferiblemente en la que la pimaricina está presente en una cantidad de 25 mg/l a 250 mg/l, más preferiblemente en la que la pimaricina está presente en la bebida en una cantidad de 50 mg/l a 200 mg/l, incluso más preferiblemente en la que la pimaricina está presente en la bebida en una cantidad de 75 mg/l a 150 mg/l.
4. Bebida según la reivindicación 1, que comprende además dicarbonato de dimetilo, preferiblemente en la que el dicarbonato de dimetilo está presente a una concentración inicial en el intervalo de 75 mg/l a 250 mg/l.
5. Bebida según la reivindicación 1, que comprende además un edulcorante seleccionado de rebaudiósido A, acesulfamo K o aspartamo.
6. Bebida según la reivindicación 1, que comprende además un secuestrante, preferiblemente en la que el secuestrante es EDTA o EDDS o mezclas de los mismos.
7. Bebida según la reivindicación 1, que comprende además al menos uno de hexametáfosfato de sodio, polifosfato o ácido difosfónico.
8. Bebida según la reivindicación 1, en la que el componente de bebida comprende al menos uno de agua añadida, un zumo, un aromatizante, un edulcorante, un acidulante, un colorante, una vitamina, un agente tamponante, un espesante, un emulsionante y un agente antiespumante.
9. Bebida según la reivindicación 8, en la que el zumo es un zumo de fruta de al menos una de naranja, pomelo, limón, lima, mandarina, manzana, uva, arándano rojo, frambuesa, arándano azul, fresa, piña, pera, melocotón, granada, ciruela, cereza, mango, papaya, lichi y guayaba.
10. Bebida según la reivindicación 1, en la que la bebida es una bebida carbonatada, una bebida no carbonatada, un refresco, un zumo de fruta, una bebida aromatizada de zumo de fruta, una bebida aromatizada de fruta, una bebida energética, una bebida hidratante, una bebida deportiva, una bebida de salud y bienestar, una bebida de dispensador, una bebida congelada lista para beber, una bebida carbonatada congelada, un concentrado líquido, una bebida de café, una bebida de té, una bebida láctea, una bebida de soja, una bebida vegetal, un agua aromatizada, un agua potenciada o una bebida alcohólica.
11. Bebida según la reivindicación 1, que comprende además ácido cinámico.
12. Método de formación de una bebida según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende:

55 formar un sistema de conservante de bebidas que comprende un complejo de pimaricina-ciclodextrina; y

añadir el sistema de conservante de bebidas a al menos un componente de bebida para formar una bebida que tiene un pH de 2,5 a 5,6; en el que la bebida cuando se coloca dentro de un recipiente sellado no se deteriora sustancialmente por microorganismos durante un periodo de al menos 16 semanas.
13. Bebida que puede obtenerse según el método según la reivindicación 12.
14. Uso de un complejo de ciclodextrina-pimaricina como agente conservante para una bebida, en el que la bebida tiene un pH de 2,5 a 5,6, y en el que el complejo de ciclodextrina-pimaricina impide el deterioro de la bebida dentro de un recipiente sellado durante un periodo de al menos 16 semanas.

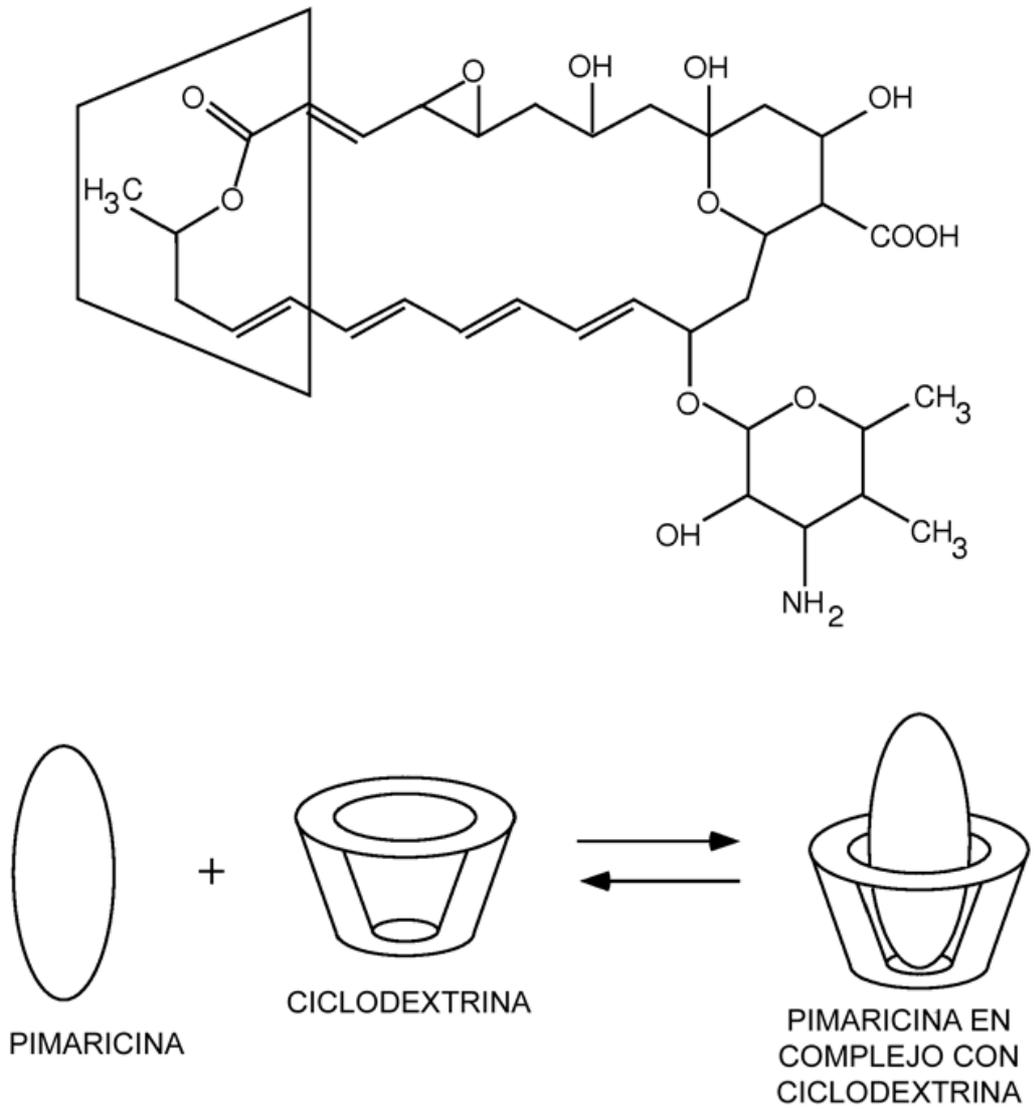


Fig. 1

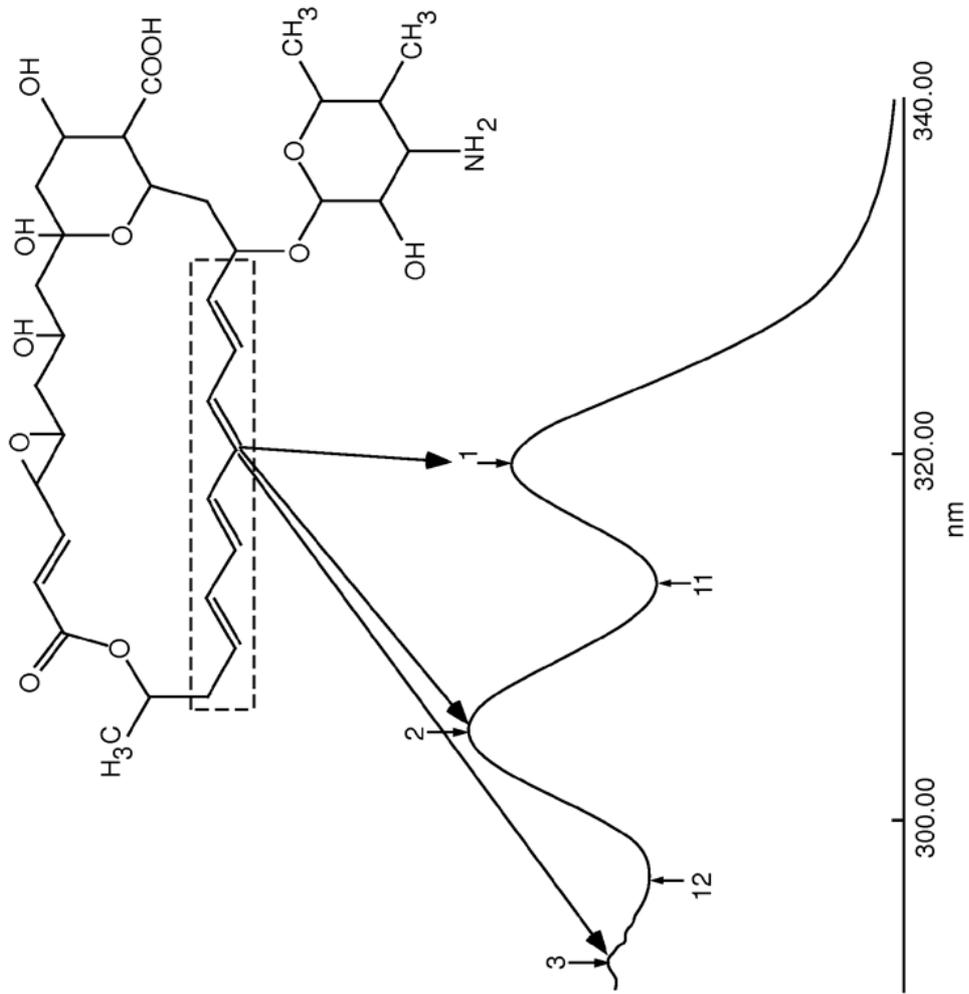


Fig. 2

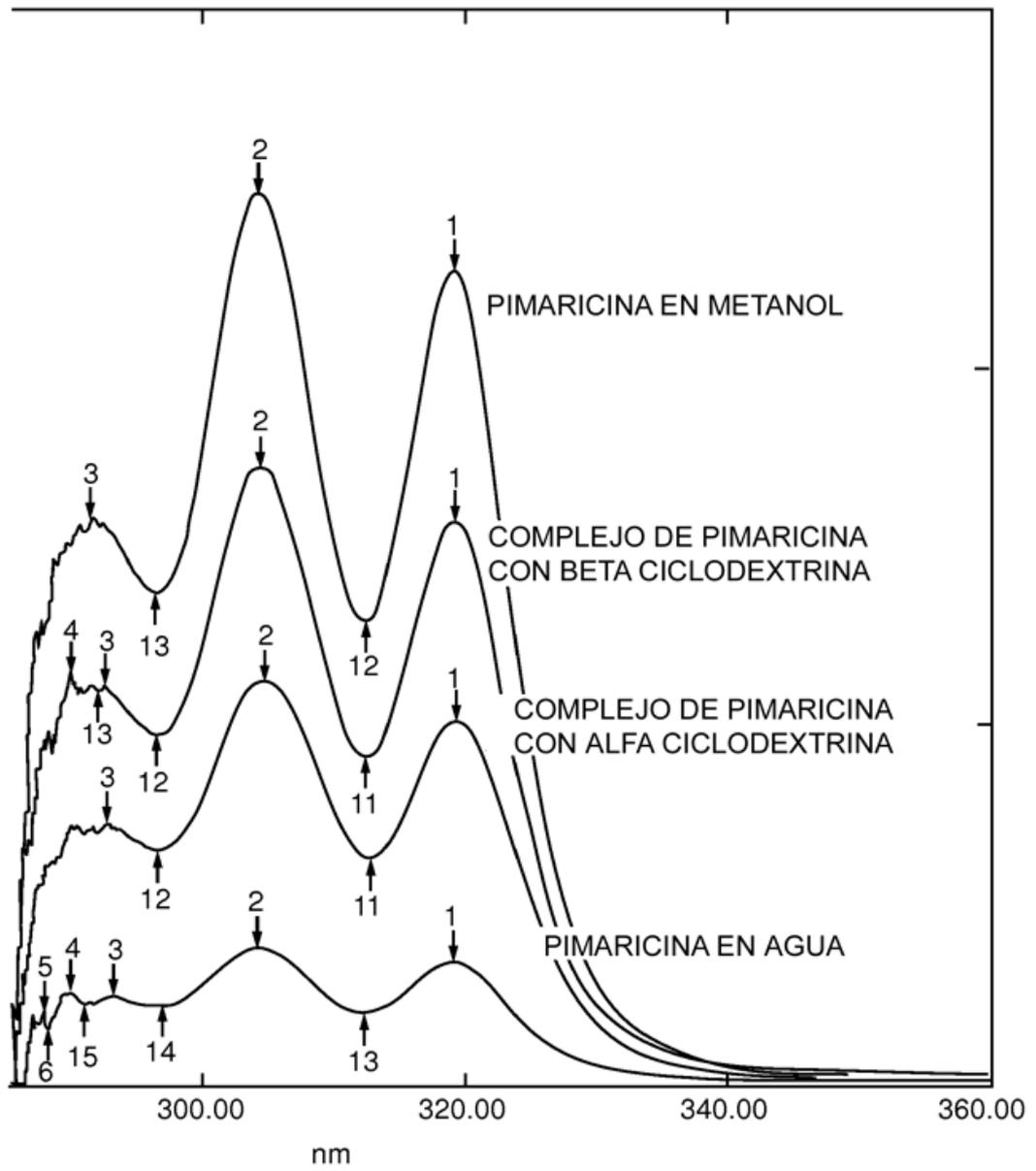


Fig. 3

TOLERANCIA DE ESPECIES DE MOHO A LA PIMARICINA (PPM)

CONTROL NEG.	ASPERGILLUS (CA ¹)	T. SPECTABILIS	P. GLABRUM	B. FULVA	N. FISCHERI	T. FLAVUS	T. FLAVUS VAR FLAVUS	[PIMARICINA] PPM
○	●	●	●	●	●	●	●	0.00
○	●	●	●	●	●	●	●	3.19
○	●	●	●	●	●	●	●	3.47
○	●	●	●	●	●	●	●	3.77
○	●	●	●	●	●	●	●	4.10
○	●	●	●	●	●	●	●	4.46
○	●	●	●	●	●	●	●	4.85
○	●	●	●	●	●	●	●	5.27
○	●	●	○	●	●	●	●	5.73
○	●	●	○	●	●	●	●	6.22
○	●	●	○	●	●	●	●	6.77
○	●	●	○	●	●	●	●	7.35
○	●	●	○	●	●	●	●	8.0
○	●	●	○	○	●	●	●	8.7
○	●	●	○	○	●	●	●	9.4
○	●	○	○	○	●	●	●	10.3
○	●	○	○	○	●	●	●	11.2
○	●	○	○	○	●	●	●	12.1
○	●	○	○	○	●	●	●	13.2
○	●	○	○	○	●	●	●	14.3
○	●	○	○	○	●	●	●	15.6
○	●	○	○	○	●	●	●	16.9
○	●	○	○	○	●	●	●	18.4
○	●	○	○	○	●	●	●	20

Fig. 4