

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 632**

51 Int. Cl.:

A23L 2/44	(2006.01)
A23L 3/015	(2006.01)
A23L 3/3463	(2006.01)
A23L 3/3508	(2006.01)
A23L 3/3526	(2006.01)
A23L 3/3562	(2006.01)
A23L 2/52	(2006.01)
A23L 2/54	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.01.2014 PCT/US2014/013722**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.08.2014 WO14120857**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2014 E 14746322 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 2950670**

54 Título: **Sistema de conservante de bebidas basado en pimaricina y gas de espacio de cabeza**

30 Prioridad:

31.01.2013 US 201361758988 P

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

29.05.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SMITH, RICHARD T. y
SANNITO, DAN**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 763 632 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 basado en pimaricina y gas de espacio de cabeza

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a sistemas de conservante de bebidas y a productos de bebida que comprenden los sistemas de conservante. En particular, la presente invención se refiere a sistemas de conservante de bebidas que tienen formulaciones adecuadas para satisfacer la demanda del consumidor de ingredientes saludables y respetuosos con el medio ambiente.

ANTECEDENTES

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

Por ejemplo, el ácido benzoico y sus sales se usan comúnmente en productos de bebidas como conservantes. Sin embargo, en algunas formulaciones de bebidas que poseen 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 incrementan la velocidad de esta reacción, por lo que se debe tener especial cuidado en la producción y el almacenamiento de dichos productos de bebidas cuando incluyen tanto benzoato como ácido ascórbico como ingredientes. La ingesta de benceno en el agua potable también es una preocupación de salud pública.

El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y sus sales también son un conservante común de productos de bebidas. El EDTA secuestra iones metálicos y puede afectar a su participación en cualquiera de un número de reacciones químicas. El EDTA se ha convertido en una preocupación medioambiental predominantemente debido a su persistencia y fuertes propiedades quelantes de metales.

Los polifosfatos son otro tipo de secuestrante empleado como conservante para productos de bebidas. Sin embargo, los polifosfatos no son estables en solución acuosa y se degradan rápidamente a temperatura ambiente. La degradación de los polifosfatos da como resultado problemas sensoriales insatisfactorios en el producto de bebida, tales como cambios en la acidez. Además, el tiempo de vida útil del producto de bebida se puede ver comprometido a medida que la concentración de polifosfato se deteriora.

Se requieren nuevos sistemas de conservante para su uso en bebidas como sustitutos de sistemas de conservante que tienen efectos perjudiciales sobre la salud y/o el medio ambiente o que carecen de suficiente estabilidad. Dichos sistemas deberían proporcionar un impacto sensorial mejorado. La publicación US 2010/0323065 proporciona un sistema de conservante de bebidas que contiene un complejo de pimaricina-ciclodextrina para su uso en bebidas.

Un objetivo de la presente solicitud es mejorar la estabilidad y las características sensoriales de la pimaricina y los complejos de pimaricina-ciclodextrina, en particular en bebidas ácidas. Un objetivo adicional es mejorar la eficacia de la pimaricina en bajas concentraciones para proporcionar opciones de consumo asequibles.

50 SUMARIO

Un aspecto de la invención se refiere a un producto de bebida en un recipiente sellado de acuerdo con la reivindicación 1.

En la reivindicación 8 se describe un procedimiento para preparar una bebida en un recipiente sellado de acuerdo con la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

60 La FIG. 1 representa el crecimiento de organismos que producen deterioro a baja concentración de O₂.

La FIG. 2 representa la cinética de degradación de pimaricina en bebidas simuladas en ausencia de β-ciclodextrina.

65 La FIG. 3 representa la pérdida de pimaricina a lo largo del tiempo como una función del contenido de O₂ (ppb) y la presencia o ausencia de complejo (modelado) en STP.

La FIG. 4 representa la cinética de degradación de la pimaricina y el inicio del deterioro.

La FIG. 5 representa la degradación de la pimaricina en presencia de una cantidad igual de β -ciclodextrina cuando la bebida se somete a una presión de 3,7 volúmenes de CO₂.

La FIG. 6 representa que, en presencia de presión de CO₂, una concentración muy baja de pimaricina (0,8 ppm) en presencia de una cantidad igual de ciclodextrina proporciona protección frente al deterioro por levaduras que producen deterioro *Zygosaccharomyces* y *Brettanomyces*.

10 DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención contempla la estabilización del agente antifúngico de calidad alimentaria, la pimaricina, frente al efecto de degradación del oxígeno de una manera que no comprometa la actividad de la pimaricina hacia los hongos que típicamente son la causa del deterioro de bebidas con alto contenido en ácido. La invención no requiere la exclusión del oxígeno de las bebidas. De hecho, el contenido de oxígeno de las bebidas carbonatadas es típicamente bastante alto, aproximadamente la mitad del oxígeno que se encuentra en una bebida no carbonatada. Sorprendentemente, la cantidad de pimaricina requerida para conservar el producto es al menos un orden de magnitud menor de lo que se informa en la literatura o se divulga en diversas patentes.

La presente invención reside en una interacción entre gases distintos del oxígeno, la presión ejercida por los gases distintos del oxígeno y el complejo de ciclodextrina con pimaricina. Aunque no se desea adherirse a ninguna teoría, la invención puede reflejar un posicionamiento de la pimaricina inducido por la presión dentro del núcleo de la molécula de ciclodextrina de modo que los enlaces químicos en general reactivos entre los átomos de la pimaricina se vuelven inaccesibles para el oxígeno. Como se demuestra en diversos estudios, la invención no depende de una reducción de las concentraciones de oxígeno en la bebida. De hecho, las pruebas disponibles indican que la estabilidad general de la pimaricina en suspensión acuosa como un complejo con ciclodextrina solo mejora ligeramente con respecto a la pimaricina sola desde la perspectiva de un tiempo de vida útil de 16 semanas. Aunque no depende de la reducción o eliminación del oxígeno del líquido, la presente invención todavía se beneficiaría de cualquier reducción del contenido de oxígeno en la bebida que se pueda lograr.

La presente invención se puede entender en el contexto de la química física que determina las interacciones de un líquido y de los gases en contacto con el líquido. El agua o cualquier bebida en fase acuosa (>95 % de agua) que comparta una interfaz con la atmósfera contendrá una cantidad de los gases que están presentes en la atmósfera. El aire está compuesto de 78,08 % de nitrógeno (N₂), comprende 20,95 % de oxígeno (O₂), 0,93 % de argón y cantidades menores de CO₂, helio, criptón e hidrógeno. El N₂ y el O₂ combinados constituyen el 99,04 % del gas total encontrado en el aire. La cantidad de cada tipo de gas que se incorporará a la solución se determina fácilmente mediante el uso de la ley de Henry y el conocimiento de un valor conocido como la constante de Henry (K_H). La ley de Henry establece que, a una temperatura constante, la cantidad de gas disuelto en un tipo y volumen de líquido dados es directamente proporcional a la presión parcial de ese gas en equilibrio con el líquido. Esta relación se puede expresar matemáticamente como sigue.

$$[X_{(ac.)}] = K_H * p_X$$

La ecuación se traduce para significar que la concentración del componente gaseoso X en la fase acuosa es igual al producto de la constante de Henry para el gas y la presión parcial del gas en equilibrio con el líquido. El valor, p_x , es la presión ejercida por la molécula en cuestión como un gas. A una presión atmosférica, la presión parcial de N₂ es 0,78 y la de O₂ es 0,2095. Las constantes de Henry son conocidas y están fácilmente disponibles en diversas referencias. La forma en que se puede expresar la constante varía. Cuando se expresa como [mol_{gas}/L*atm], el valor de K_H para el N₂ es 6,48 x 10⁻⁴ y para el O₂ es 1,28 x 10⁻³ en agua a 25 °C. Los valores variarán ligeramente en función del pH, la presencia de soluto y la temperatura. Si están presentes a presiones idénticas, los valores de K_H indican que el nitrógeno será menos soluble en agua en una relación mol a mol. La diferencia en los pesos moleculares del O₂ y del N₂ (31,9988 frente a 28,0134, respectivamente) sirve para acentuar la diferencia cuando el valor en moles por litro se convierte a gramos por litro. La concentración de gases en un líquido se puede expresar de diferentes maneras. En el presente documento se va a emplear el uso de partes por mil millones (ppb) (microgramo·l⁻¹, mcg·l⁻¹, ppb).

Una pequeña cantidad de vapor de agua ocupará la fase gaseosa que está en contacto con agua líquida. Si la fase gaseosa es aire a 25 °C, las presiones parciales de N₂ y O₂ son, respectivamente, 0,7566 y 0,203 atm. Empleando valores apropiados para la constante de Henry, se puede establecer que la concentración de N₂ en el agua es de 1372,84 ppb y la concentración de O₂ en el agua es de 8320 ppb. Es posible confirmar los valores calculados por procedimientos analíticos.

Dependiendo de la altitud y de los patrones climáticos, la atmósfera genera una presión de aproximadamente 1 atmósfera, lo que equivale a 14,7 libras por pulgada cuadrada (psi). A menos que un líquido, tal como una bebida, se someta a un proceso para eliminar el gas (desaireación) o se infunda con un gas a presión, el contenido de

gas de la bebida al sellarla en un recipiente no será diferente del que tendría si el líquido hubiera quedado abierto a la atmósfera. El líquido contendrá una cantidad de O₂ gas similar a la calculada anteriormente, aproximadamente 8300 ppb.

5 Además, la aplicación de cierres a un recipiente requiere en general que un recipiente no se pueda llenar hasta el borde. El espacio no ocupado por el líquido estará ocupado por una cierta cantidad de gas. Típicamente, el volumen no ocupado por el líquido se denomina "espacio de cabeza". Si el espacio de cabeza no se elimina o desplaza con un gas distinto del aire, la atmósfera en el espacio de cabeza será aire. Si un líquido a 25 °C está en equilibrio con el aire en el instante de su llenado y sellado en un recipiente, el aire de la región del espacio de cabeza del recipiente no producirá una lectura de presión manométrica por encima de cero. La presión de gas dentro del recipiente (absoluta) es la misma que la presión en el exterior del recipiente y los manómetros típicamente proporcionan lecturas (presión manométrica) solo cuando la presión es superior a la presión absoluta.

15 Como se entiende comúnmente, las bebidas en fase acuosa se pueden "carbonatar". La carbonatación es un proceso en el cual se disuelve dióxido de carbono en agua. La cantidad de dióxido de carbono que se puede incorporar a la solución viene determinada por la ley de Henry de la misma manera que los gases contenidos en el aire. La constante de Henry para el CO₂ es de aproximadamente $3,4 \times 10^{-2}$ (mol/L*atm). A presiones parciales idénticas, el CO₂ es 26 veces más soluble que el O₂. Empleando recipientes con un diseño especial, es posible exponer el agua a una atmósfera de CO₂ a presión casi puro, de modo que el agua se cargue con un volumen predeterminado de CO₂. Es común que las referencias científicas informen de la absorción de un gas por un líquido en términos de mililitros de gas por litro de líquido. Un litro de agua a 15,5 °C (60 °F) que está en contacto inmediato con una fase gaseosa que es 1 atmósfera de CO₂ absorberá exactamente 1 mililitro de CO₂. Dado que el CO₂ posee una densidad de 1,96 g/ml a 15,5 °C, también es cierto que, a 15,5 °C, 1 atmósfera de CO₂ en contacto inmediato con el agua dará como resultado una concentración de CO₂ de 1,96 g por litro. Dado que la presión del gas es 1 atm, cuando dicho líquido se encierre en un recipiente herméticamente sellado, presentará una presión manométrica de 0 psi (presión de 1 atmósfera absoluta).

25 Las leyes de los gases subyacentes determinan que, si los volúmenes de líquido y gas y la temperatura se mantienen constantes, duplicar la cantidad de gas presente en la fase gaseosa dará como resultado el doble de presión de gas. Un litro de agua a 15,5 °C (60 °F) que está expuesto a CO₂ presente en 2 atmósferas (indicador de 14,7 psi) absorberá 2 volúmenes de CO₂ o 2 * 1,96 gramos de CO₂. Dicho proceso es el empleado para formular las bebidas carbonatadas. Los volúmenes típicos de CO₂ en las bebidas varían de 2 a 4,5 volúmenes de CO₂. Típicamente, la adición de dióxido de carbono (CO₂) al producto (carbonatación) se logra permitiendo que una corriente de bebida se esponga a una fase gaseosa de CO₂ a presión dentro de los límites de un recipiente a presión.

35 La acción de la carbonatación no sirve para expulsar otros gases del agua. Para eliminar cantidades medibles de oxígeno del agua, el agua se debe someter a un proceso conocido como desaireación. El agua empleada en la elaboración de bebidas se puede o no someter a desaireación. Además, el alcance o grado de desaireación varía según la categoría de producto. Los fabricantes de cerveza emplean en general un proceso exhaustivo de desaireación, de modo que el contenido de oxígeno de la cerveza en el envase sea inferior a 0,2 ppm (200 ppb). Los fabricantes de bebidas carbonatadas emplean procesos de desaireación menos exigentes. Típicamente, los ingredientes o las bebidas formuladas no se someten a ningún tipo de desaireación para evitar la eliminación de componentes de aroma volátiles. Al llenar un recipiente con la bebida carbonatada, una pequeña cantidad de CO₂ se pierde de la bebida y se incorpora a la región del espacio de cabeza. En consecuencia, una parte de pero no todo el aire que había ocupado el espacio de cabeza es desplazado. Datos de estudio del producto de los estantes de las tiendas indican que el contenido de oxígeno de las bebidas carbonatadas enlatadas puede variar de 500 a >4500 ppb y en promedio se aproxima mucho a 1200 ppb. Los productos envasados en vidrio tienden a tener concentraciones más altas de O₂, que varían desde 750 hasta 4500 ppb en un estudio de productos de diferentes fabricantes y ubicaciones de fabricación. El producto en envases de PET contiene una concentración inicial de O₂ de aproximadamente 1000-1500 ppb de O₂. Con el tiempo, la concentración se incrementa hasta entre 2500 y 3000 ppb. Esto refleja el hecho de que el PET es permeable al O₂ y que, durante un periodo de tiempo, la tendencia es que la concentración de O₂ en el recipiente alcance el equilibrio con la atmósfera (aproximadamente 8300 ppb). La concentración inicial de O₂ en las bebidas carbonatadas refleja una serie de fenómenos. Como se indica previamente, el agua empleada para la producción se trata en general mediante procedimientos de desaireación. El agua se mezcla típicamente en diversas proporciones con concentrados. Típicamente, los concentrados no se someten a desaireación y contendrán una cantidad medible de oxígeno. Además, inmediatamente después del llenado, la cantidad de CO₂ presente en el espacio de cabeza sirve para desplazar cierta cantidad de aire.

60 El hecho de que las bebidas carbonatadas contengan una cantidad medible de oxígeno es relevante por dos razones importantes con respecto a la estabilidad frente al deterioro por diversos microorganismos. Primero, los microorganismos disponen de una cantidad de oxígeno y esto evita que los organismos tengan que emplear vías metabólicas de obtención de energía menos eficientes tales como la respiración fermentativa o anaerobia. La energía obtenida por vías metabólicas se emplea en el ensamblaje de moléculas complejas que se requieren para el crecimiento y la reproducción. Los informes en la literatura indican que los tipos de organismos que pueden deteriorar las bebidas carbonatadas no tienen en general limitada su capacidad de deterioro del producto

por la restricción del contenido de O₂. Esto es cierto al menos cuando las concentraciones iniciales de oxígeno son superiores a 200 ppb. Los datos generados para este estudio sirven para confirmar este punto (Ejemplo de referencia 1, FIG. 1). Como se indica previamente, la mayoría de los productos carbonatados, incluida la cerveza, poseen una cantidad de O₂ inicial superior a 1000 ppb. En segundo lugar, una cantidad de oxígeno superior a 1000 ppb es una fracción relativamente grande de la cantidad de oxígeno que estaría presente en agua no tratada (8350 ppb) que esté abiertamente expuesta al aire.

Además del elemento nutritivo del O₂ con respecto al crecimiento de organismos que producen deterioro, también es cierto que el O₂ puede actuar degradando compuestos a través de mecanismos que no requieren el consumo de oxígeno en la reacción. Dichas reacciones son una consecuencia de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las que el oxígeno simplemente sirve como intermediario en la transferencia de electrones en reacciones de tipo REDOX que finalmente dan como resultado la degradación de moléculas más complejas tales como la pimaricina. A este respecto, el O₂ se comporta de manera similar a un catalizador. De forma similar a muchas reacciones que implican un catalizador, la cantidad de oxígeno requerida para llevar a cabo dichas reacciones es muy pequeña. A este respecto, es de interés evaluar la estabilidad de la pimaricina en solución en diferentes condiciones de tensión de oxígeno. Claramente, también es de interés establecer si la formación de un complejo entre pimaricina y β-ciclodextrina sirve para estabilizar la pimaricina frente a la degradación por reacción con oxígeno. El Ejemplo de referencia 2, FIG. 2 demuestra cómo es posible establecer la velocidad de degradación de la pimaricina en solución. En resumen, la pimaricina produce un espectro UV-visible muy distintivo con 3 máximos de absorción separados. A medida que la pimaricina se degrada, las alturas de los picos disminuyen. La degradación se puede rastrear a través de la disminución de la altura de pico de cualquier máximo de pico individual o a través de los cambios en la altura de pico relativa.

Dado un procedimiento para monitorizar los cambios en la concentración de pimaricina, es posible establecer si la pimaricina se degrada de manera diferente en función de variables tales como la tensión inicial de oxígeno de la solución. El Ejemplo de referencia 3, FIG. 3 captura los resultados de la degradación de la pimaricina durante un periodo de tiempo de varios meses en función de la tensión inicial de oxígeno y de la presencia o ausencia de un complejo entre la pimaricina y la β (beta)-ciclodextrina. En el presente documento, parecería que la pimaricina se degrada con bastante rapidez cuando no está complejada y cuando está presente en agua que contiene una cantidad de oxígeno superior a 8500 ppb. Disminuir la concentración de oxígeno hasta 3500 ppb no afecta de manera medible a la velocidad de degradación. Cuando la pimaricina se compleja con la β (beta)-ciclodextrina en presencia de 8500 ppb de O₂, la degradación se ralentiza, pero no se evita.

Como resulta evidente, la pimaricina (natamicina) es un agente antifúngico que es susceptible a la oxidación de manera medible. La degradación de la pimaricina da como resultado la pérdida de actividad antifúngica. Sería incorrecto suponer que la adición de pimaricina a una suspensión de organismos da como resultado la eliminación instantánea de todos los organismos viables. Es igualmente incorrecto suponer que todos los organismos se destruyen o que se impide de otro modo su crecimiento después de una exposición a la pimaricina de solo unas pocas horas o incluso días. Con este fin, cabe señalar que los valores medidos, tales como la concentración inhibidora mínima (CIM) o la concentración letal mínima (CLM), pueden ser algo engañosos. Técnicamente, la CLM es la concentración mínima que da como resultado la muerte de algunos, pero no necesariamente todos, los organismos de una población o muestra. De forma similar, la CIM es una concentración de sustancia que sirve para reducir la velocidad de desarrollo en la mayoría de, pero no todos, los organismos de una población. Con el tiempo, los organismos que son más tolerantes que los organismos promedio de la población pueden continuar creciendo a velocidades casi normales. Es importante destacar que si la concentración inicial de agente antifúngico fue, de hecho, inhibidora para la totalidad de la población, es posible que la degradación del agente antifúngico provoque una disminución de la concentración eficaz de modo tal que un subconjunto de organismos pueda reanudar el crecimiento.

De hecho, este es el resultado que se encuentra cuando los organismos que pueden deteriorar las bebidas carbonatadas están presentes en las bebidas con diferentes concentraciones iniciales de pimaricina. El Ejemplo 2, Tabla 1, proporciona datos que indican que, después de varias semanas desde el inicio de un estudio en el que se inocularon levaduras que producen deterioro en una bebida carbonatada con concentraciones de pimaricina, se desarrolla el deterioro.

El inicio del deterioro a lo largo del tiempo es un reflejo de la concentración inicial de pimaricina. La tabla destaca el inicio relativamente lento del deterioro durante un periodo de tiempo relativamente largo, pero que todavía es inaceptable desde la perspectiva de las expectativas de tiempo de vida útil. Es importante resaltar que solo aquellas muestras que contenían 25 ppm de pimaricina permanecen libres de deterioro durante el tiempo de vida útil.

En ausencia de datos analíticos sobre la estabilidad de la pimaricina en solución, la interpretación de los datos sobre la estabilidad del producto a lo largo del tiempo se puede interpretar de dos maneras. O bien no se produjo degradación de la pimaricina y el producto se deterioró debido al sobrecrecimiento de esos pocos organismos que eran tolerantes a la cantidad de pimaricina presente o bien el deterioro se produjo como consecuencia de la supervivencia y posterior sobrecrecimiento de organismos como consecuencia de la degradación de la pimaricina por debajo de cierta concentración crítica. Se ofrece un fuerte argumento para esto último en el Ejemplo de

referencia 4, FIG. 4. En el presente documento, la degradación de la pimaricina se rastrea desde concentraciones iniciales de 13 y 25 ppm en paralelo con la incidencia previamente establecida de deterioro en muestras que inicialmente contenían 13 y 25 ppm. Se debe recordar que el producto que contenía 25 ppm de pimaricina no sufrió ningún deterioro entre las muestras evaluadas y que las muestras que contenían una concentración inicial de 13 ppm de pimaricina experimentaron una incidencia del 33 % de deterioro, pero solo después de 80 días de incubación. La intersección entre el momento del inicio del deterioro y la curva de degradación de 13 ppm de pimaricina indica que se produce deterioro cuando la concentración de pimaricina desciende por debajo de 1,5 a 2 ppm. No es sorprendente que la concentración de pimaricina en muestras que inicialmente contenían 25 ppm no descienda por debajo del intervalo de 1,5-2 ppm durante el transcurso del tiempo de vida útil esperado y, por lo tanto, que no se produzca deterioro. Concretamente, la prueba se realizó en una bebida carbonatada que contenía 3,6 volúmenes de CO₂. El producto contiene una cantidad de O₂ superior a 2000 ppb.

Los resultados son relevantes por dos razones. En primer lugar, si fuera posible mantener la concentración de pimaricina en 2-3 ppm, entonces el producto se podría conservar sin el deterioro producido por los tipos de organismos de levadura que son susceptibles de deteriorar las bebidas carbonatadas durante un periodo igual al tiempo de vida útil requerido del producto. Estos resultados son en general sorprendentes y en general no serían anticipados por alguien con experiencia en la técnica. En general, los valores de CIM informados para los tipos de levadura que pueden deteriorar las bebidas carbonatadas están en el intervalo de al menos ≥10 ppm. El otro punto relevante es que cualquier posibilidad de conservar el producto con pimaricina parece depender de la adición de tanto como 25 ppm de pimaricina al principio. Esto es problemático porque 25 ppm de pimaricina tienen en general un coste prohibitivo y, lo que es más importante, va más allá de lo que permitirían las agencias reguladoras. Las agencias reguladoras a menudo asignan un límite a la cantidad total de una sustancia que se puede consumir durante toda la vida de los productos en los que se introduce la sustancia. Para la pimaricina, la ingesta diaria admisible (IDA) es del orden de 0,3 mg por kg de peso corporal. Una fracción muy grande de la IDA para pimaricina se produce con el consumo de productos cárnicos y de queso. Las agencias reguladoras evalúan la IDA sobre la base de la concentración inicial de ingrediente y, por lo tanto, no hay provisión de degradación de la pimaricina a lo largo del tiempo. Se estima que el límite de pimaricina en bebidas no será mayor de 10 ppm y puede ser de tan solo 5 ppm.

Dicho todo esto, no es posible emplear pimaricina como conservante en una bebida a menos que la concentración inicial sea inferior a 6 ppm y se pueda mantener a una concentración de al menos 2 ppm durante un periodo de tiempo equivalente al tiempo de vida útil (120 días). Los resultados disponibles indican que la pimaricina no es suficientemente estable en las bebidas carbonatadas, a pesar de un contenido de O₂ reducido de manera medible en comparación con líquidos acuosos que no están carbonatados. Además, la pimaricina se compleja con β-ciclodextrina no está protegida de manera medible frente a la degradación. La pimaricina complejada con β-ciclodextrina se degrada a una velocidad de aproximadamente un 60 % de la velocidad a la que lo hace la pimaricina en ausencia de β-ciclodextrina. Aunque es una mejora, la concentración inicial de pimaricina en la bebida todavía necesitaría estar entre 17 y 20 ppm para garantizar la estabilidad del producto.

Por tanto, es inesperado y sorprendente encontrar que la pimaricina complejada con β-ciclodextrina resulta ser estable de manera medible cuando está en solución bajo presión de un gas de espacio de cabeza distinto del oxígeno. Es igualmente sorprendente e inesperado que el producto se pueda conservar con una concentración inicial de pimaricina de tan solo 0,1 a 5 ppm. Es en particular sorprendente encontrar que el producto se pueda conservar con una concentración de pimaricina que está entre 0,5 y 1 ppm, ya que se sabe que solo hay otra sustancia que sea bioestáticamente medible a dichas concentraciones (nisina). Solo es posible especular acerca de cómo se usa la presión para inducir potencia. De forma similar, no está claro cómo puede actuar la presión del gas del espacio de cabeza en colaboración con la β-ciclodextrina de una manera tal que altere la velocidad de degradación de la pimaricina. Aunque no se desea adherirse a ninguna teoría, es posible que la presión sirva para que la porción de pimaricina que está unida al núcleo de ciclodextrina se vea forzada a hacerlo en una posición que provoque que uno o más dobles enlaces sean menos accesibles que en ausencia del gradiente de presión.

Cuando está presente en una solución que se somete a la presión generada por 3,7 volúmenes de CO₂ (32 psi a 60 °F), los patrones de degradación de la pimaricina complejada con β-ciclodextrina son muy diferentes a los patrones de degradación de la pimaricina que está libre de β-ciclodextrina. En primer lugar, la altura relativa del máximo de pico se mantiene en el tiempo. En segundo lugar, la velocidad de degradación parece ser bimodal. (Ejemplo de referencia 5, FIG. 5). En definitiva, la estructura química de la pimaricina se mantiene en general durante todo el periodo de tiempo de la prueba y es muy posible que este sea un factor que contribuya de manera muy importante a la capacidad de la pimaricina para demostrar una CIM a la concentración percibida increíblemente baja de 0,8 ppm. El patrón de degradación bimodal probablemente refleje el hecho de que la pimaricina que está libre de β-ciclodextrina se degradará a una velocidad diferente que la pimaricina que está unida a β-ciclodextrina. De hecho, a concentraciones inferiores a 20 ppm, muy poca pimaricina se asociaría con la β-ciclodextrina. Parece que la presión del gas del espacio de cabeza puede inducir la formación de un complejo (a modo de estimación, quizás tanto como un 37 % de pimaricina está unido).

En resumen, se entiende que existe una fuerte correlación entre el alcance de la oxidación de la pimaricina y su pérdida de actividad antifúngica. La pimaricina se puede estabilizar frente a la oxidación mediante un proceso en dos etapas. La actividad biológica de la pimaricina no solo se conserva, sino que posiblemente se puede potenciar gracias al proceso en dos etapas.

5

En la primera etapa del proceso, se hace que la pimaricina se compleje con la β -ciclodextrina. El complejo resultante es de un tipo conocido como complejo de inclusión; un componente (hospedador) forma una cavidad en la cual se puede insertar una segunda molécula (huésped) en ausencia de una unión covalente. A través de la formación del complejo, la pimaricina puede estar presente en soluciones acuosas a una concentración superior a 400 ppm. Este es un rasgo característico importante cuando se procesa el producto para preparar el embotellado. En general, los ingredientes en preparación para el procesamiento tendrán que estar presentes en una concentración que sea al menos 5 veces mayor que la presente en el producto final. Esto se debe a que los ingredientes se preparan como un concentrado y se mezclan a continuación con agua de una manera que da como resultado una dilución del concentrado de 4 o 5 veces.

10

15

Una dilución que dé como resultado una concentración de pimaricina de menos de 20 ppm provocará que toda la pimaricina esté libre de β -ciclodextrina. Sin embargo, las pruebas disponibles hasta la fecha indican que someter una solución que contiene <25 ppm de pimaricina a ciertas cantidades de presión obligará a la pimaricina a volver a complejarse con β -ciclodextrina. La cantidad de pimaricina complejada es varias veces menor que la existente en el complejo cuando la concentración de pimaricina es superior a 25 ppm. Sin embargo, la pimaricina unida a la ciclodextrina es estable de manera medible frente a la degradación. El oxígeno está normalmente presente en la bebida a una concentración de al menos 2500 ppb y puede llegar hasta 5500 ppb. Se produce degradación, pero a una velocidad reducida en relación con la que se produce en ausencia de β -ciclodextrina.

20

25

Es importante apreciar la naturaleza de la disposición entre la pimaricina y la β -ciclodextrina. El papel de la β -ciclodextrina no es "solubilizar" la pimaricina. La β -ciclodextrina sirve más bien como molécula hospedadora de la pimaricina, la molécula huésped. El complejo resultante es de un tipo conocido como complejo de inclusión; un componente (hospedador) forma una cavidad en la cual se puede insertar una segunda molécula (huésped) en ausencia de una unión covalente. El complejo resultante es de un tipo conocido como complejo de inclusión. La molécula huésped reside preferentemente en el espacio ofrecido por el hospedador debido a interacciones de van der Waals favorables. A diferencia de la disposición conocida como clatratos, la molécula huésped no está completamente encerrada, sino que reside en un agujero de rosquilla. En el sentido bioquímico del término, la molécula huésped más pequeña también se puede denominar "ligando". Típicamente, la formación de inclusión se produce solo en el caso en que la concentración de la molécula huésped supera el límite normal de solubilidad. En el caso de la pimaricina, el límite normal de solubilidad está en el intervalo de 20 a 25 ppm en una bebida de pH ácido a una temperatura de 25 °C. Sin embargo, bajo la influencia de la presión del gas del espacio de cabeza, se induce a la pimaricina a formar un complejo con β -ciclodextrina incluso cuando la concentración de pimaricina es inferior a 20 ppm. La fracción de pimaricina que se incorpora al complejo con ciclodextrina es en realidad bastante baja en comparación con la constante de unión de la ciclodextrina para la pimaricina, pero la cantidad de pimaricina que se une es suficiente para el propósito de conservar la bebida carbonatada.

30

35

40

En la invención, el ligando huésped es pimaricina (natamicina) y la molécula hospedadora es β -ciclodextrina. Cabe señalar que la pimaricina es una molécula grande de manera medible en comparación con muchos ligandos que típicamente se complejan con la β -ciclodextrina. Como consecuencia, no es posible que toda la pimaricina resida dentro de la cavidad formada por la ciclodextrina. Esto se confirma fácilmente evaluando la dimensión de la cavidad en relación con el tamaño de la molécula de pimaricina. En consecuencia, una porción de la molécula sobresale por encima del horizonte formado por la estructura de anillo de la ciclodextrina. En condiciones de temperatura y presión ambiente estándar (25 °C y 1 atm.), el complejo de inclusión de pimaricina con β -ciclodextrina permite que haya una concentración de pimaricina presente en un sistema acuoso que es decididamente mayor que la que se puede lograr en ausencia de β -ciclodextrina. En ausencia de β -ciclodextrina, el límite de solubilidad de la pimaricina en solución acuosa es de aproximadamente 20-25 mg·l⁻¹. Cuando se compleja con β -ciclodextrina, es posible lograr 400 mg·l⁻¹.

45

50

Una bebida de solución acuosa que presenta un pH en el intervalo de 2,4 a 5,6, contenida en un recipiente sellado y en contacto inmediato con un gas de espacio de cabeza en el que la concentración de pimaricina en solución no es mayor de 5 ppm. Es posible que la pimaricina esté presente en una concentración de 1 ppm. Menos preferente pero aceptable es una concentración de 0,5 ppm. También debe estar presente una cantidad de β -ciclodextrina que proporcione al menos una proporción 1:1 de pimaricina y β -ciclodextrina. Esta proporción permite la formación de una cantidad suficiente de complejo, de modo que se conserve una cantidad suficiente de pimaricina durante un periodo de 120 días. Solo una fracción de pimaricina permanecerá complejada con la β -ciclodextrina cuando la concentración total de pimaricina sea inferior a 20-25 ppm. La fracción será un reflejo de la presión ejercida sobre la porción líquida de la bebida.

55

60

Una bebida de solución acuosa contenida en un recipiente sellado y en contacto inmediato con un gas de espacio de cabeza. Finalmente, se logrará el equilibrio (horas) entre el gas absorbido por el líquido y el gas presente en el espacio de cabeza. Al alcanzar el equilibrio, una porción del gas que está presente en el líquido y en el espacio de cabeza será oxígeno. Por necesidad de la presente invención, la cantidad de oxígeno debe ser

65

- inferior a 8300 mcg. Preferentemente, la cantidad de oxígeno no será mayor de 5000 mcg. Decididamente preferente es un contenido de oxígeno inferior a 500 mcg. Cabe señalar que la cantidad total de oxígeno en el espacio de cabeza se puede expresar en términos de concentración (ppb) o en términos de la cantidad (microgramos). En el presente documento y en las reivindicaciones instantáneas se está utilizando mcg, ya que el espacio de cabeza no es constante para todos los tipos de bebidas y, por lo tanto, mcg es ligeramente más exacto a menos que se conozca el tipo de bebida. Por ejemplo, en el Ejemplo de referencia 3, la bebida se conoce; por lo tanto, ppb es una medida exacta.
- El oxígeno se puede eliminar de la bebida de varias maneras. Un gas distinto del oxígeno se puede inyectar en el líquido y esto provocará el desplazamiento del O₂ de la solución siempre que la fase gaseosa presente sobre el líquido se cargue con el mismo gas que el empleado en el rociado. Por ejemplo, es posible desplazar el O₂ de la solución empleando un rociador de N₂, pero el espacio sobre la parte superior del líquido necesita mantenerse libre del oxígeno liberado de la bebida mediante un flujo de gas N₂.
- Una bebida de solución acuosa contenida en un recipiente sellado y en contacto inmediato con un gas de espacio de cabeza. El gas del espacio de cabeza debe estar presente en una cantidad tal que ejerza una presión sobre la bebida que sea equivalente a al menos 3 atmósferas absolutas (indicador de 2 atmósferas (44,08 psi absolutos o indicador de 29,39 psi)). Por razones distintas a la estabilidad del producto, la presión del gas puede ser tan grande como sea necesaria. Por ejemplo, muchas bebidas carbonatadas presentan de 4,5 a 4,7 volúmenes de CO₂ que producen una presión de 44 psi a 60 °C.
- El gas empleado para proporcionar presión debe ser distinto del oxígeno. Los gases preferentes para nosotros son dióxido de carbono (CO₂) o nitrógeno (N₂). Sin embargo, otros gases son aceptables en la medida en que el gas sea inerte con respecto a los ingredientes contenidos en la bebida. Otros gases que en general se entiende que son inertes incluyen argón (Ar), monóxido de nitrógeno también conocido como óxido nítrico (NO), monóxido de dinitrógeno también conocido como óxido nitroso también conocido como gas hilarante (NO₂), dióxido de azufre (SO₂), xenón (Xe), neón (Ne) o helio (He), monóxido de carbono (CO). En términos generales, estos gases se emplearán en cantidades similares al N₂ o al CO₂ para proporcionar una presión superior a 2 atmósferas. La cantidad real de cada tipo de gas que se requiere se determina fácilmente y no variará significativamente de un tipo de gas a otro.
- El gas se puede añadir por medio de un rociador en el que se hace burbujear gas a través del líquido, o se puede añadir gas licuado en forma de gotas, como suele ser el caso cuando se añade nitrógeno (nitrógeno líquido). Los líquidos de fase acuosa que tienen una superficie expuesta al aire habrán adquirido una cantidad de oxígeno en el líquido. A menos que se elimine por la fuerza, el oxígeno, una vez equilibrado, pasará a formar parte del gas del espacio de cabeza. También es posible añadir formas líquidas de gas que a continuación se convierten de nuevo en gas cuando se mezclan con líquido a una temperatura superior al punto de congelación del líquido. También es posible reducir de manera medible la cantidad de gas (aire).
- La invención es aplicable en un intervalo de pH de 2,4 a al menos 5,6, en particular de 2,8 a 4,4. El pH no tiene un impacto medible sobre la presión del gas dentro del recipiente. La solución y el gas necesitan estar delimitados por un recipiente que se pueda sellar, pero el recipiente no necesita ser impermeable al oxígeno. Sin embargo, el cuerpo y el sello del recipiente deben servir para retardar de manera medible la entrada de O₂ de la atmósfera. El simple acto de presurizar el recipiente con un gas que no sea O₂ sirve en general para ralentizar la entrada de O₂ a través de películas de polímero tales como el tereftalato de polietileno (PET).
- En el presente documento, la bebida se define como una solución de fase en gran parte acuosa que contiene tanto como un 16 por ciento de sólidos (según lo determinado por el refractómetro) en forma de azúcares, sustancias nutritivas (vitaminas, suplementos energéticos, etc.), aromas, colores. La invención es aplicable a cualquier bebida que presente un pH en el intervalo de 2,5 a 5,6. Por ejemplo, la invención se podría emplear con té preparado de forma natural que típicamente presenta un pH cercano a 5,5. Además, la invención es aplicable al uso en cualquier formulación de bebida que presente un pH tan alto como 5,6. Dicho pH se puede producir en ciertas formulaciones de reemplazo de electrolitos o agua aromatizada.
- El riesgo de deterioro por bacterias o la preocupación por la salud pública de las bacterias patógenas transmitidas por los alimentos para cualquier formulación de producto debería quedar cubierto por un agente físico o químico distinto de la pimaricina, independientemente del pH en el intervalo seleccionado. La pimaricina solo es eficaz contra hongos de levadura y moho. Los medios para impedir el sobrecrecimiento de bacterias son variados. Los ácidos orgánicos débiles se añaden a muchos tipos de bebidas para lograr un pH por debajo de 4,5. Al hacerlo, la bebida alcanza el estado regulatorio de un alimento "acidificado" o una "bebida alimenticia con alto contenido en ácido". Los zumos 100 % derivados de la mayoría de las frutas son ácidos de manera natural y presentan un pH inferior a 4,5. Dichos productos no pueden favorecer el crecimiento de todos los organismos patógenos conocidos que con mayor frecuencia se asocian a infecciones de origen alimentario.
- Aunque no pueden favorecer el crecimiento de agentes patógenos, dichos productos, en ausencia de intervención por parte de agentes químicos o físicos, pueden favorecer el crecimiento de otros microorganismos tales como hongos de moho, hongos de levadura, bacterias de ácido láctico (LAB), *Alicyclobacillus* y *Acetobacter*.

Los organismos que deterioran el producto, pero que no son motivo de preocupación desde la perspectiva de la salud, se denominan conjuntamente en el presente documento "organismos que producen deterioro". A menudo, el crecimiento de estos organismos en las bebidas se puede inhibir impidiendo que los nutrientes estén disponibles en las concentraciones que son necesarias para satisfacer los requisitos de crecimiento de las bacterias. En términos generales, las bacterias son más fastidiosas que los hongos de levadura y moho. Por ejemplo, muchos tipos de bacterias que producen deterioro requieren la presencia de una o más vitaminas para poder crecer en las bebidas.

Además o en lugar de privación de nutrientes, el complejo de β -ciclodextrina y pimaricina se puede complementar con 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, se pueden emplear con la pimaricina. En la medida en que el complejo de β -ciclodextrina y pimaricina puede reducir las concentraciones de otros conservantes, se obtiene una ventaja desde la perspectiva del coste o de atributos sensoriales. El sistema de conservante de bebidas puede comprender además ácido sórbico, ácido cinámico, sales del mismo, EDTA, ácido etilendiamina-N,N'-disuccínico (EDDS), ácido etilendiamina-N,N'-dimalónico (EDDM), ácido etilendiamina-N,N'-diglutámico (EDDG), hexametáfosfato de sodio (SHMP), metafosfato ácido de sodio (SAMP), fosfonato, bis-fosfonato, N-bis-fosfonato. El sistema de conservante de bebidas puede comprender además un eliminador de radicales (antioxidante) tal como ácido ascórbico.

En general, el sistema de conservante de bebidas incorpora un límite para la concentración 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, de aproximadamente 0,54 mM o menos. La presente invención puede incluir opcionalmente el uso de agua para procesar el producto que se ha tratado para eliminar cationes metálicos con el fin de lograr concentraciones seleccionadas de minerales que son empleados por los microorganismos durante el crecimiento. A diferencia de las enseñanzas del documento US 6.268.003, el procedimiento preferente de tratamiento es por medio de procesos físicos de 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 es preferente. El uso de medios químicos para reducir la dureza del agua a menudo da como resultado un incremento de la concentración de cationes monovalentes específicos, por ejemplo, cationes de potasio, que sirven para comprometer la invención descrita en el presente documento. En determinados modos de realización ejemplares, 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.

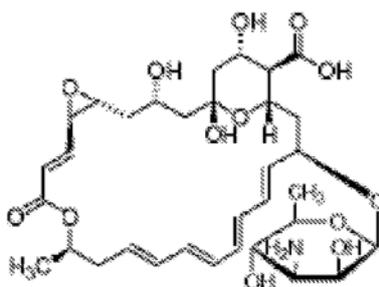
Como se entiende comúnmente en la técnica, las definiciones de los términos "conservar", "conservante" y "conservación" no transmiten ninguna especificidad con respecto al periodo de tiempo durante el cual una sustancia o formulación permanecerá libre de deterioro. Además, el término "conservado" también puede significar estar libre de eventos distintos del deterioro microbiano. Por ejemplo, un producto se puede conservar con respecto a la descomposición de ingredientes, la pérdida de atributos sensoriales o la decoloración. En consecuencia, el término "conservación" debe proporcionar un contexto para transmitir cualquier relevancia científica o práctica. Como se usan en el presente documento, los términos independientes "conservar", "conservante" y "conservación" se refieren a evitar completamente el deterioro resultante de la presencia y crecimiento de la clase general de microorganismos conocidos como microorganismos que producen deterioro con alto contenido en ácido durante un periodo de al menos 120 días. De forma específica para el uso de pimaricina en el presente documento, los términos "conservación", "conservante" y "conservar" se limitan a la conservación media frente a levaduras que pueden deteriorar bebidas con alto contenido en ácido. Tipos representativos, pero no inclusivos, de levaduras para los cuales la pimaricina es un conservante eficaz en la presente invención son especies del género *Brettanomyces*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Kloeckera*, *Rhodotorula* y *Torulopsis*.

El periodo de 120 días durante el cual el producto debe permanecer libre de deterioro refleja el tiempo requerido para transportar un producto de bebida desde la localización de fabricación, a través de los canales de distribución, hasta el consumidor. La ausencia de deterioro se observa por la ausencia de cualquier prueba de crecimiento de organismos que producen deterioro (turbidez, recuento viable, recuento microscópico directo u otros procedimientos estándar de enumeración) y por la ausencia de cualquier cambio discernible en los atributos del producto que se pueda atribuir de forma rutinaria al metabolismo de organismos que producen deterioro.

Como se usa en el presente documento, se entiende que el término "inhibir" significa detener o evitar por completo.

Típicamente, 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 a la duración de la exposición a cualquier temperatura dada.

La pimaricina es un compuesto bioactivo natural que sirve para impedir el crecimiento de hongos de levadura y moho. Otro nombre común de la pimaricina es natamicina. El nombre sistemático IUPAC de 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}]octacos-8,14,16,18,20-pentaeno-25-carboxílico. Una segunda versión del nombre IUPAC de 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}]octacos-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 IDA recomendada es de 0-0,3 mg/kg de peso corporal.



PIMARICINA

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 superen los 180 °C (356 °F). Desafortunadamente, la pimaricina no es en particular soluble en soluciones acuosas. Demuestra una solubilidad en agua pura (25 °C) de solo 0,052 mg/ml (52 mg/L), donde el pH se estima en aproximadamente 6,4. (La pimaricina presenta un único grupo carboxílico que dirige el valor de pH ácido).

"Concentración inhibidora mínima" (CIM) es otro término para el cual no se define o entiende de forma rutinaria ningún periodo de tiempo estándar. En el ámbito médico, la CIM se emplea con frecuencia 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 Wikipedia). Sin embargo, el resto de la comunidad científica ha adoptado el término CIM para referirse a cualquiera de un número de condiciones de periodo de incubación y grado de inhibición.

Incluso dentro del ámbito médico, se reconoce que un valor de CIM desarrollado durante un periodo de incubación de 24 horas puede no ser el mismo valor desarrollado después de 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 una CIM medible en relación con el control positivo después de 48 horas.

Los productos de bebidas de acuerdo con la presente invención incluyen bebidas tanto carbonatadas como no carbonatadas. En el presente documento, el término bebida carbonatada incluye cualquier combinación de agua, zumo, aroma y edulcorante que se pretende consumir como un líquido sin alcohol y que también se prepara para que presente una concentración de dióxido de carbono de 0,2 volúmenes de CO₂ o más. Se entiende que el término "volumen de CO₂" significa una cantidad de dióxido de carbono absorbida en el líquido en la 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, refrescos de cola, lima-limón, jengibre y bebidas de cerveza de raíz que se carbonatan de la misma forma que los refrescos, así como bebidas que proporcionan beneficios para la salud o el bienestar por la presencia de sustancias metabólicamente activas, tales como vitaminas, aminoácidos, proteínas, carbohidratos, lípidos o polímeros de los mismos. Dichos productos también se pueden formular para que contengan leche, café o té u otros sólidos botánicos. También es posible formular dichas bebidas para que contengan uno o más productos nutracéuticos. En el presente documento, un producto nutracéutico es una sustancia que se ha demostrado que presenta, como mínimo, un beneficio general o específico para la salud o bien una sensación de bienestar como se documenta en revistas o textos profesionales. Sin embargo, los productos nutracéuticos no actúan necesariamente curando o previniendo tipos específicos de afecciones médicas.

En el presente documento, el término "bebida no carbonatada" es cualquier combinación de agua y un ingrediente que se pretende consumir de la misma manera que una bebida líquida sin alcohol y que presenta no más de 0,2 volúmenes de dióxido de carbono. 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. Dichas bebidas se pueden complementar con

vitaminas, aminoácidos, sustancias a base de proteínas, a base de carbohidratos o a base de lípidos. Como se indica, la invención incluye productos que contienen zumo, ya sean carbonatados o no carbonatados. Las "bebidas que contienen zumo" o "bebidas de zumo", independientemente de si son carbonatadas o no carbonatadas, son productos que contienen algunos o todos los componentes de una fruta, vegetal o fruto seco o una mezcla de los mismos que se pueden suspender o solubilizar en la fracción líquida natural de la fruta.

El término "vegetal", cuando se usa en el presente documento, incluye tanto la porción fructífera como la no fructífera pero comestible de plantas tales como tubérculos, hojas, cáscaras y también, si no se indica de otro modo, cualquier grano, fruto seco, vaina y brote que se proporcione como zumos o aromas de bebidas. A menos que lo dicten las 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, los productos de zumo y las bebidas de zumo se pueden obtener de la fruta de manzana, arándano, pera, melocotón, ciruela, albaricoque, nectarina, uva, cereza, pasa, frambuesa, grosella espinosa, mora, arándano, fresa, limón., naranja, pomelo, fruta de la pasión, mandarina, ciruela mirabel, tomate, lechuga, apio, espinacas, repollo, berros, 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, clementina y mezclas de las mismas. Los zumos preferentes son los zumos de cítricos, y los más preferentes son los zumos que no son de cítricos, manzana, pera, arándano rojo, fresa, uva, papaya, mango y cereza.

La invención se podría usar para conservar una formulación que es esencialmente el 100 % de zumo pero el producto no se puede etiquetar como que contiene el 100 % de zumo. La invención se puede usar en productos que contienen zumo en los que la concentración de zumo es inferior al 100 %. La reducción de la concentración de zumo por debajo del 10 % favorecerá en general el uso de concentraciones reducidas de conservantes. Las formulaciones que contienen concentraciones de zumo tan altas como el 10 % se pueden conservar mediante la presente invención y ciertamente una bebida que contiene menos del 10 % de zumo se conservaría mediante la presente invención, una bebida que contiene no más del 5 % de zumo se conservaría mediante la presente invención. Se puede usar cualquier zumo para preparar la bebida de la presente invención. Si se desea un concentrado de bebida, el zumo de fruta se concentra por medios convencionales de aproximadamente 12° Brix a aproximadamente 65° Brix. Los concentrados de bebidas son normalmente 40° Brix o más (aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 75 % de sólidos de azúcar).

Típicamente, las bebidas presentarán un intervalo específico 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 al ácido a disociarse del ácido cuando el ácido está en solución (pK_A). Cualquier solución con un pH medible entre 0 y 14 presenta algunos, como se refleja en la concentración medible o calculable, protones libres. Sin embargo, en general se entiende que aquellas soluciones que presentan un pH por debajo de 7 son ácidas y aquellas con un pH por encima de 7 son básicas. El acidulante puede ser orgánico o inorgánico. Un ejemplo no exclusivo de ácidos inorgánicos son los ácidos fosfóricos. Ejemplos no exclusivos de ácidos orgánicos son los ácidos 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 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 se pueden combinar con sales de los mismos o de diferentes ácidos para gestionar el pH o la capacidad 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 se incrementa desde 2,6 hasta pH 7,2. Para bebidas con alto contenido de ácido, la invención no está limitada por el tipo de acidulante empleado en la acidificación del producto. Se puede usar prácticamente cualquier sal de ácido orgánico, siempre que sea comestible y no proporcione un aroma desagradable. La elección de la sal o la mezcla de sales estará determinada por la solubilidad y el sabor. El citrato, el malato y el ascorbato producen complejos ingeribles cuyos aromas se consideran bastante aceptables, en particular en las bebidas de zumo de frutas. El ácido tartárico es aceptable, en particular en las bebidas de zumo de uva, como lo es el ácido láctico. Se pueden usar ácidos grasos de cadena más larga, pero pueden afectar al aroma y a la solubilidad en agua. Para esencialmente todos los propósitos, los restos malato, gluconato, citrato y ascorbato son suficientes.

Determinados modos de realización ejemplares 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 también pueden contener cloruro de sodio, ácido cítrico, citrato de sodio, fosfato de monopotasio, así como otras sustancias naturales o artificiales que sirven para restablecer el equilibrio de electrolitos perdido durante la transpiración.

En determinados modos de realización ejemplares, la presente invención también incluye formulaciones de bebidas complementadas con vitaminas liposolubles. 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

- 5 vitaminas liposolubles se pueden añadir en una cantidad de restauración, es decir, suficiente para reemplazar la vitamina presente naturalmente en una bebida tal como zumo o leche, que se puede haber perdido o inactivado durante el procesamiento. Las vitaminas liposolubles también se pueden añadir en una cantidad nutricionalmente suplementaria, es decir, una cantidad de vitamina que se considera aconsejable que un niño o un adulto consuma en función de las CDR y otras normas similares, preferentemente de aproximadamente una a tres veces la CDR (cantidad diaria recomendada). Otras vitaminas que se pueden añadir a las bebidas incluyen vitamina B (ácido nicotínico), ácido pantoténico, ácido fólico, vitamina D, vitamina E, vitamina B y tiamina. Estas vitaminas se pueden añadir a niveles de desde el 10 % al 300 % de la CDR.
- 10 Suplementos: La invención se puede ver comprometida por la presencia de determinados tipos de suplementos, pero esto no es incuestionable y variará de una formulación de bebida a otra. El grado en que se compromete la invención 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, los suplementos de calcio pueden comprometer la invención, pero no en el mismo grado que los suplementos de cromo. Los
- 15 suplementos de calcio se pueden añadir hasta un grado en que no se supere un valor crítico de concentración total de calcio. Las fuentes de calcio que son compatibles con la invención incluyen complejos de calcio con ácido orgánico. Entre las fuentes de calcio preferentes está el "citrato-malato de calcio", como se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.786.510 y la patente de EE. UU. n.º 4.786.518 concedidas a Nakel *et al.* (1988) y la patente de EE. UU. n.º 4.722.847 concedida a Heckert (1988). Otras fuentes de calcio compatibles con la
- 20 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 se pueden incluir cloruro de calcio y sulfato de calcio; sin embargo, a niveles superiores tienen un sabor astringente.
- 25 Componente de aroma: Los productos de bebidas de acuerdo con 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 distintos del fruto; es decir, derivados de la vaina, los frutos secos, la corteza, las raíces y las hojas. También se incluyen dentro del término "aroma botánico" los aromas preparados de manera sintética para simular aromas botánicos derivados de fuentes naturales. Ejemplos de tales aromas incluyen cacao, chocolate, vainilla, café, cola, té y similares. Los aromas botánicos se pueden derivar de fuentes naturales tales como aceites esenciales y extractos, o se pueden preparar de manera sintética. El término "aromas a fruta" se refiere a aquellos 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" los aromas preparados de manera sintética para simular aromas a fruta
- 30 derivados de fuentes naturales.
- 35 También se pueden emplear aromas artificiales. Ejemplos no exclusivos de aromas artificiales incluyen chocolate, fresa, vainilla, cola o aromas artificiales que imitan un aroma natural y se pueden utilizar para formular una bebida no carbonatada o 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 bebidas de la presente invención ("potenciador del aroma") puede 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.
- 40 Individualmente, el sistema de conservante de bebidas de acuerdo con la presente invención es compatible con bebidas formuladas para contener una esencia acuosa. Como se usa en el presente documento, el término "esencia acuosa" se refiere al aroma y los materiales de sabor solubles en agua que se derivan de los zumos de fruta. Las esencias acuosas pueden ser esencias fraccionadas, concentradas o plegadas, o enriquecidas con componentes añadidos. Como se usa en el presente documento, el término "aceite de esencia" se refiere al aceite o fracción insoluble en agua del aroma y de 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 por evaporación del zumo de naranja. El aceite de esencia se puede fraccionar, concentrar o enriquecer. Como se usa en el presente documento, el término "aceite de cáscara" se refiere al aroma y sabor derivados de las naranjas y otras frutas cítricas y se compone en gran medida de hidrocarburos terpénicos, por ejemplo, aldehídos y cetonas alifáticos, terpenos oxigenados y sesquiterpenos. En los zumos aromatizados de cítricos se usan de
- 45 aproximadamente el 0,002 % a aproximadamente el 1,0 % de esencia acuosa y aceite de esencia.
- 50 Componente edulcorante: La función de conservación microbiológica de la presente invención en una formulación de bebida de concentración única no se ve afectada por el tipo de edulcorantes presentes en la bebida. El edulcorante puede ser cualquier edulcorante empleado comúnmente para su uso en bebidas. Los edulcorantes adecuados para su uso en diversos modos de realización de las bebidas divulgadas 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. Los péptidos que presentan sabor dulce también están permitidos. Los
- 55 sacáridos más comúnmente empleados incluyen sacarosa, fructosa, dextrosa, maltosa y lactosa y azúcar invertido. Se pueden usar mezclas de estos azúcares. Se pueden usar otros carbohidratos naturales si se desea menos o más dulzor. Los edulcorantes no nutritivos adecuados y las combinaciones de dichos edulcorantes se
- 60
- 65

5 seleccionan por las características nutricionales deseadas, el perfil de sabor de la bebida, la sensación en la boca y otros factores organolépticos. Los edulcorantes artificiales no nutritivos adecuados para al menos determinados modos de realización ejemplares incluyen, por ejemplo, edulcorantes basados en péptidos, por ejemplo, aspartamo, neotamo y alitama, y edulcorantes no basados en péptidos, por ejemplo, sacarina sódica, 10 sacarina cálcica, acesulfamo potásico, ciclamato de sodio, ciclamato de calcio, neohesperidina dihidrochalcona y sucralosa. En determinados modos de realización ejemplares, el producto de bebida emplea aspartamo como edulcorante, solo o con otros edulcorantes. En otros determinados modos de realización ejemplares, el edulcorante comprende aspartamo y acesulfamo potásico. Otros edulcorantes no nutritivos adecuados para al menos determinados modos de realización ejemplares incluyen, por ejemplo, sorbitol, manitol, xilitol, glicirricina, 15 D-tagatosa, eritritol, meso-eritritol, malitol, maltosa, lactosa, fructo-oligosacáridos, polvo Lo Han Guo, mogrósido 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 de proteínas tales como taumatina, monelina, brazzeína, D-alanina y glicina, compuestos relacionados y mezclas de cualquiera de ellos. Estará dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, dado el beneficio de la presente divulgación, seleccionar edulcorantes nutritivos y no nutritivos adecuados y combinaciones de los mismos. La cantidad de edulcorante eficaz en las mezclas de bebidas de la invención depende del edulcorante particular utilizado y de la intensidad de dulzor deseada.

20 Por tanto, aspectos de la invención se refieren a un producto de bebida en un recipiente sellado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la bebida no se deteriora sustancialmente debido a microorganismos durante un periodo de al menos 16 semanas cuando se almacena a temperatura ambiente. La bebida puede ser una bebida carbonatada.

25 La bebida comprende pimaricina en una cantidad de 0,1 a 6 ppm, 0,1 a 5 ppm, 0,1 a 4 ppm, 0,1 a 3 ppm, o 0,1 a 2 ppm. La bebida además contiene ciclodextrina. El pH de la bebida es de 2,4 a 5,6, en particular de 2,8 a 4,4.

30 El producto de bebida comprende además un gas de espacio de cabeza de acuerdo con la reivindicación 1 que es inerte para los ingredientes de la bebida en el que la presión del gas de espacio de cabeza es al menos 3 atm absolutas. El oxígeno presente en el gas del espacio de cabeza es una cantidad inferior a 8300 mcg, inferior a 5000 mcg o inferior a 500 mcg.

35 En aspectos de la invención, la pimaricina y la ciclodextrina se añaden a la bebida como un complejo. La proporción entre la pimaricina y la ciclodextrina en el complejo es 1:1. La ciclodextrina puede ser β -ciclodextrina, α -ciclodextrina, γ -ciclodextrina, sulfobutil éter β -ciclodextrina, hidroxipropil β -ciclodextrina, β -ciclodextrina metilada al azar y maltosil/dimaltosil β -ciclodextrina.

40 Otros aspectos se refieren a un procedimiento para preparar una bebida en un recipiente sellado de acuerdo con la reivindicación 8 añadiendo a un recipiente la bebida descrita anteriormente; añadiendo a continuación suficiente gas de espacio de cabeza inerte para los ingredientes en la bebida para proporcionar una presión de al menos 3 atm absolutas, y sellando el recipiente. Como se indica anteriormente, la bebida se puede formar añadiendo la pimaricina y la ciclodextrina a la bebida como un complejo.

45 Ejemplo de referencia 1

La concentración de oxígeno puede limitar el crecimiento de algunos, pero no de todos, los organismos que producen deterioro. Los organismos se inocularon en formulaciones de bebidas simuladas (2-5 % de zumo, 12 Brix, pH 3,4) y se evaluaron en busca de pruebas de crecimiento visible durante un periodo de 16 semanas.

50 El contenido de oxígeno entre las muestras se ajustó calentando la muestra en un baño de agua bajo una capa de vapor de agua saturado. El uso de sellos de membrana de goma en los recipientes permitió la inoculación después de que las muestras se enfriaran. La concentración de oxígeno se estableció a través del uso de sensores OXYSENSE® colocados sobre la superficie de contacto con el producto de los recipientes de prueba. Para cada tipo de organismo se identifica un intervalo de tensión de oxígeno que favoreció el crecimiento (), no favoreció el crecimiento () o aún no se ha probado (). Claramente, la mayoría de los organismos crecieron fácilmente a concentraciones de oxígeno tan bajas como 100 ppb.

60 Como se muestra en la Fig. 1, la barra asociada a cada organismo se divide en 3 intervalos: 1) intervalo de concentración de O₂ en el que el crecimiento era evidente, 2) intervalo que aún no se ha evaluado y 3) intervalo en el que el O₂ ha demostrado inhibir el crecimiento.

Ejemplo de referencia 2

65 La pimaricina se degrada relativamente rápido cuando está en suspensión acuosa. La Fig. 2 muestra un gráfico de la proporción del Pico 1 frente al Pico 2 del espectro UV-visible de pimaricina en bebidas (pH 3,4) en función del tiempo (a). Como se muestra en la Fig. 2, la velocidad de degradación se puede establecer a través de cambios en el espectro UV-visible observado de la pimaricina (recuadro B). Las muestras recién preparadas de

pimaricina en agua producen un espectrograma de 3 picos: pico 1 (320 nm), pico 2 (304 nm) y pico 3 (291 nm). El espectro del recuadro también muestra claramente que el máximo de absorción para cada pico difiere de un pico al siguiente. Estas diferencias son un reflejo de la estructura de dieno conjugado de la pimaricina. Dado que la integridad de la estructura conjugada da paso a la degradación, las alturas relativas de los picos están sujetas a cambios.

Un rasgo característico destacado de la degradación es un cambio en la altura relativa de un pico a lo largo del tiempo. La degradación de la pimaricina en una bebida carbonatada (3,7 volúmenes de CO₂) que contiene 3700 ppb de O₂ se establece por una disminución de la altura de pico del pico 1 (320 nm) con respecto al pico 3 (291 nm). Se obtiene un gráfico muy similar al comparar las alturas relativas de pico del pico 2 con respecto al pico 3.

Ejemplo de referencia 3

En agua que contiene 8300 ppb de O₂, la pimaricina sola se degrada a una velocidad ligeramente más rápida que el complejo de pimaricina y β-ciclodextrina. Como se muestra en la Fig. 3, la pimaricina sola en agua que contiene solo 3500 ppb de O₂ se degrada aproximadamente a la misma velocidad que la pimaricina en agua que contiene 8300 ppb de O₂. La concentración inicial de pimaricina en el complejo es ≥400 ppm y, por lo tanto, la pimaricina se une completamente a la β-ciclodextrina. Mediciones en agua destilada a pH neutro y 25 °C. Por tanto, independientemente de la presencia o ausencia de un complejo con ciclodextrina, la pimaricina está sujeta a degradación a lo largo del tiempo cuando está en solución.

Ejemplo de referencia 4

En presencia de pimaricina estructuralmente intacta, se inhibe el crecimiento de los organismos que producen deterioro. Una vez comprometida la integridad de la pimaricina sola, los organismos pueden crecer. Independientemente de la concentración inicial, la pimaricina en una bebida con 3,7 volúmenes de CO₂ se degradará a la misma velocidad. Comúnmente, las bebidas carbonatadas contienen una cantidad sustancial de oxígeno (>3500 ppb). Véase la Fig. 4. Dada una concentración inicial de 13,5 ppm, la degradación de la pimaricina es tal que la concentración de pimaricina desciende por debajo de la concentración inhibitoria mínima (...) alrededor de los 80 días. En ese momento, los organismos que producen deterioro comienzan a crecer e inducen el deterioro (χ). Una concentración inicial de 25 ppm de pimaricina dará paso a un grado de degradación medible (α), pero la concentración de pimaricina no desciende por debajo de una concentración crítica de aproximadamente 2 ppm y, por lo tanto, no se produce el deterioro resultante del sobrecrecimiento de organismos previamente inoculados.

Ejemplo de referencia 5

El cambio en el espectro UV-visible de pimaricina cuando se compleja con β-ciclodextrina en presencia de 3,7 volúmenes de CO₂ sugiere un patrón uniforme de descomposición durante los primeros 20 días, y luego un cambio a una velocidad de descomposición más lenta. Véase la Fig. 5. Esto puede ser un reflejo del hecho de que no toda la pimaricina en solución está unida a la β-ciclodextrina.

El patrón de degradación de la pimaricina en solución con ciclodextrina cuando está bajo una presión de 3,7 volúmenes de CO₂ es diferente que tiene en el caso de la pimaricina sola en agua y bajo una presión de aire de 1 atmósfera. Es importante destacar que la altura relativa de pico (b) del pico 1 y del pico 2 permanecen casi constantes (a diferencia de las diferentes velocidades de degradación en ausencia de CO₂, véase la Fig. 2).

La degradación todavía se produce, como lo demuestra la pérdida en paralelo de absorción máxima a lo largo del tiempo tanto del pico 1 como del pico 2 (A). Sin embargo, la degradación es bimodal. Aproximadamente la mitad de la pimaricina se degrada relativamente rápido en el transcurso de 20 días (A), aunque a continuación la velocidad de degradación cambia y es más lenta de manera medible (después de 20 días). El patrón es muy sugerente de algún grado de protección de la estructura conjugada de la pimaricina frente al ataque de especies radicales de oxígeno. La explicación más simple es que parte, pero no toda, la pimaricina es forzada a introducirse en la cavidad de la ciclodextrina debido a la presión del CO₂ y esto permite que parte, pero no toda, la pimaricina esté protegida frente a la degradación. Posiblemente, se produce un posicionamiento de la pimaricina inducido por presión en la cavidad de la ciclodextrina. En definitiva, la velocidad de degradación parece ralentizarse considerablemente cuando la pimaricina está presente en solución con ciclodextrina y la presión del CO₂.

Ejemplo 1

Se llevó a cabo una prueba de 16 semanas con un zumo de uva simulado con el 2 % de uva 12 Brix y una botella simulada de vidrio "pony" de 9,8 oz. Las bebidas se carbonataron a 3,7 y 4,5 volúmenes. Cinco recipientes de cada nivel de CO₂ no se inocularon y sirvieron como controles negativos. Se inocularon cinco recipientes de cada nivel de CO₂ con un inóculo agrupado de cepas de *Saccharomyces*, *Brettanomyces* y *Zygosaccharomyces* de modo que se lograra una densidad celular inicial de 100 organismos por mililitro. Estas muestras sirvieron como

controles positivos. La mitad de los recipientes restantes recibieron el mismo inóculo y también se dosificaron con pimaricina a una concentración de 1,1 mg·l⁻¹ (mg por litro o mg/l). Los recipientes restantes se dosificaron con pimaricina complejada con β-ciclodextrina de una manera que se proporcionara una concentración final de pimaricina de 0,8 ppm. Todas las muestras se mantuvieron a 25 °C durante el estudio. Durante el curso del estudio, se estableció la concentración de pimaricina en las muestras utilizando espectroscopía UV-Visible. Los resultados del estudio se resumen en la FIG. 6.

Todas las muestras de control positivo (sin pimaricina ni ciclodextrina) se deterioraron en 3 días (incidencia de frecuencia de 1 = 100 %).

La concentración inicial de pimaricina en las muestras sin beta-ciclodextrina es de 1,1 ppm y en las muestras con pimaricina y beta-ciclodextrina es de 0,8 ppm. Para las muestras que contienen pimaricina pero no ciclodextrina, la primera indicación de deterioro fue a los 20 días y la incidencia de deterioro entre muestras formuladas de forma similar fue de 0,6 (60 %) después de 100 días. Esto fue cierto para las muestras formuladas a 3,7 volúmenes de CO₂ (α) y 4,5 volúmenes de CO₂ (β). Se encontró que la pimaricina en ausencia de ciclodextrina se degrada a lo largo del tiempo, presentando una semivida de aproximadamente 35 días. No se detecta crecimiento durante la duración del estudio en las muestras que contienen pimaricina y beta-ciclodextrina a 3,7 (B) o 4,5 (X) volúmenes de CO₂. La pimaricina complejada con β-ciclodextrina fue estable durante un periodo de al menos 16 semanas.

Ejemplo comparativo 1

Se llevó a cabo un ensayo de 16 semanas con un producto de lima-limón carbonatado comercial conocido como Sierra Mist. Esta bebida está carbonatada a 3,6 volúmenes de CO₂ en envases de PET. Los recipientes de control negativo no recibieron inóculo. Las muestras de control positivo se inocularon con cepas de *Zygosaccharomyces* (907, 28, Marion, HP, Mt. Dew y SM Soiler) o cepas de *Brettanomyces* (Dan, H₂O₂, Cherry 7-UP, 1601-1 y SY-05). La eficacia de la pimaricina se evaluó cuando estaba presente en una cantidad (30 ppm) que solo supera el límite de solubilidad (25 ppm) en bebidas con alto contenido de ácido, así como a 5 y 15 ppm. Todas las muestras se mantuvieron a 25 °C durante el estudio. Los resultados del estudio se resumen en la Tabla 1 a continuación. Ninguna de las muestras que contenían el equivalente a 30 mg de pimaricina por ml se deterioró durante el periodo de la prueba (14 semanas, 98 días). El 33 % de las muestras que contenían 15 ppm se deterioraron y el 100 % de las muestras que contenían 5 ppm de pimaricina se deterioraron. Comparar estos resultados en vista de los resultados del Ejemplo 1.

Tiempo transcurrido		Inicio del deterioro			
		ppm de pimaricina			
Semanas	Días	0	5	15	25
0	0	0	0	0	0
1	7	100	0	0	0
2	14	100	0	0	0
3	21	100	0	0	0
4	28	100	0	0	0
5	35	100	0	0	0
6	42	100	0	0	0
7	49	100	0	0	0
8	56	100	0	0	0
9	63	100	75	0	0
10	70	100	75	0	0
11	77	100	100	33	0
12	84	100	100	33	0
13	91	100	100	33	0
14	98	100	100	33	0
15	105	100	100	33	0
16	112	100	100	33	0
17	119	100	100	33	0
18	126	100	100	33	0
19	133	100	100	33	0
20	140	100	100	33	0
21	147	100	100	33	0

ES 2 763 632 T3

		Inicio del deterioro			
Tiempo transcurrido		ppm de pimaricina			
22	154	100	100	33	0
23	161	100	100	33	0
24	168	100	100	33	0

REIVINDICACIONES

1. Un producto de bebida en un recipiente sellado que comprende:
 - 5 una bebida que tiene un pH de 2,4 a 5,6 que comprende pimaricina presente en una cantidad de 0,1 a 6 ppm y ciclodextrina; y
 - 10 un gas de espacio de cabeza seleccionado del grupo que consiste en dióxido de carbono, nitrógeno, argón, óxido nítrico, óxido nitroso, dióxido de azufre, xenón, neón, helio y monóxido de carbono, en el que la presión del gas de espacio de cabeza es al menos 303,98 kPa absolutos (3 atm absolutas),
 - 15 en el que el oxígeno está presente en la bebida en una cantidad inferior a 8300 ppb,
 - en el que la pimaricina y la ciclodextrina están presentes en la bebida como un complejo, y
 - 15 en el que la proporción entre la pimaricina y la ciclodextrina en el complejo es 1:1.
2. La bebida de la reivindicación 1, en la que la ciclodextrina se selecciona del grupo que consiste en β -ciclodextrina, α -ciclodextrina, γ -ciclodextrina, sulfobutil éter β -ciclodextrina, hidroxipropil β -ciclodextrina, β -ciclodextrina metilada al azar y maltosil/dimaltosil β -ciclodextrina, preferentemente β -ciclodextrina.
3. La bebida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el oxígeno está presente en la bebida en una cantidad inferior a 5000 ppb, preferentemente inferior a 500 ppb.
- 25 4. La bebida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la pimaricina está presente en la bebida en una cantidad de 0,1 a 5 ppm, preferentemente en una cantidad de 0,1 a 3 ppm.
5. La bebida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el gas del espacio de cabeza es dióxido de carbono o nitrógeno.
- 30 6. La bebida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la bebida tiene un pH de 2,8 a 4,4.
7. La bebida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la bebida es una bebida carbonatada, y/o en la que la bebida no es deteriorada sustancialmente por microorganismos durante un periodo de al menos 16 semanas cuando se almacena a temperatura ambiente.
- 35 8. Un procedimiento para preparar una bebida en un recipiente sellado que comprende
 - 40 a) añadir a un recipiente una bebida que tiene un pH de 2,4 a 5,6 y que comprende ciclodextrina y pimaricina, en el que la pimaricina está presente en la bebida en una cantidad de 0,1 a 6 ppm;
 - 45 b) añadir suficiente gas de espacio de cabeza seleccionado del grupo que consiste en dióxido de carbono, nitrógeno, argón, óxido nítrico, óxido nitroso, dióxido de azufre, xenón, neón, helio y monóxido de carbono para proporcionar una presión de al menos 303,98 kPa absolutos (3 atm absolutas), en el que el oxígeno está presente en la bebida en una cantidad inferior a 8300 ppb; y
 - 50 c) sellar el recipiente,
 - 50 en el que la pimaricina y la ciclodextrina están presentes en la bebida como un complejo, y
 - en el que la proporción entre la pimaricina y la ciclodextrina en el complejo es 1:1.
- 55 9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el oxígeno está presente en la bebida en una cantidad inferior a 5000 ppb, preferentemente inferior a 500 ppb.
10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en el que la pimaricina está presente en la bebida en una cantidad de 0,1 a 5 ppm, preferentemente de 0,1 a 3 ppm.
- 60 11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que el gas del espacio de cabeza es dióxido de carbono o nitrógeno.
12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que la bebida tiene un pH de 2,8 a 4,4 y/o en el que la bebida es una bebida carbonatada.
- 65 13. Una bebida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 precedentes, obtenible de acuerdo con el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 8-12.

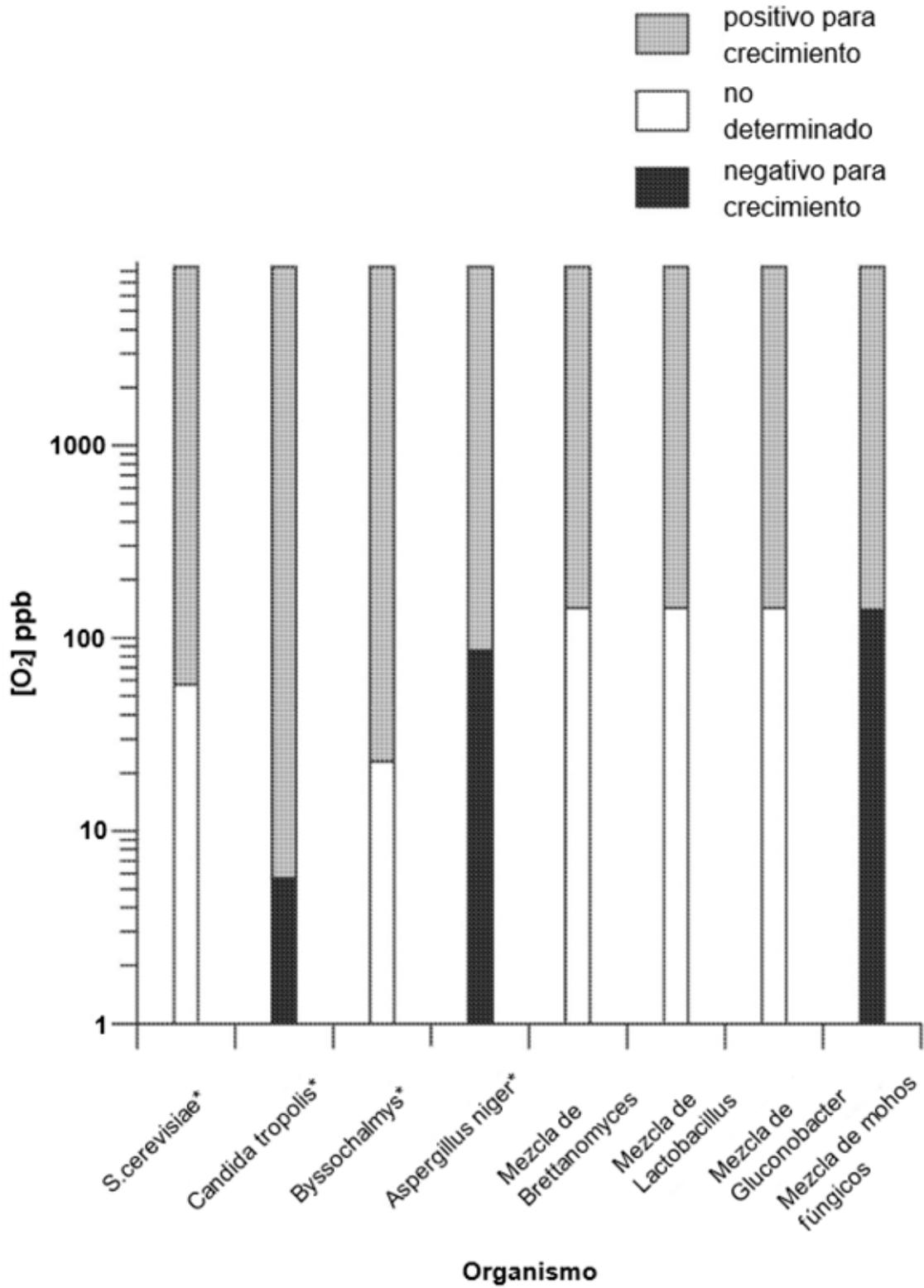


FIG.1

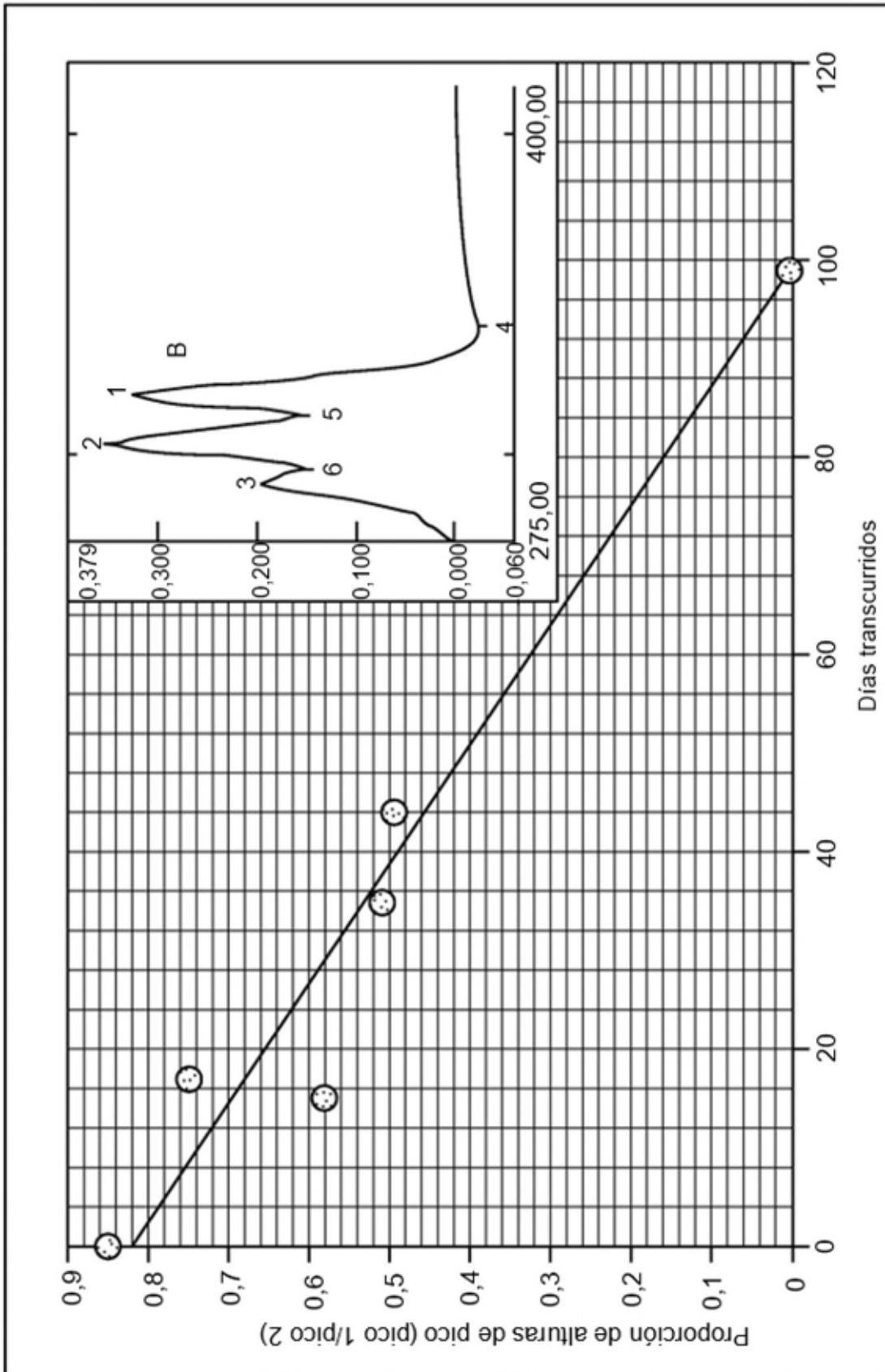


FIG.2

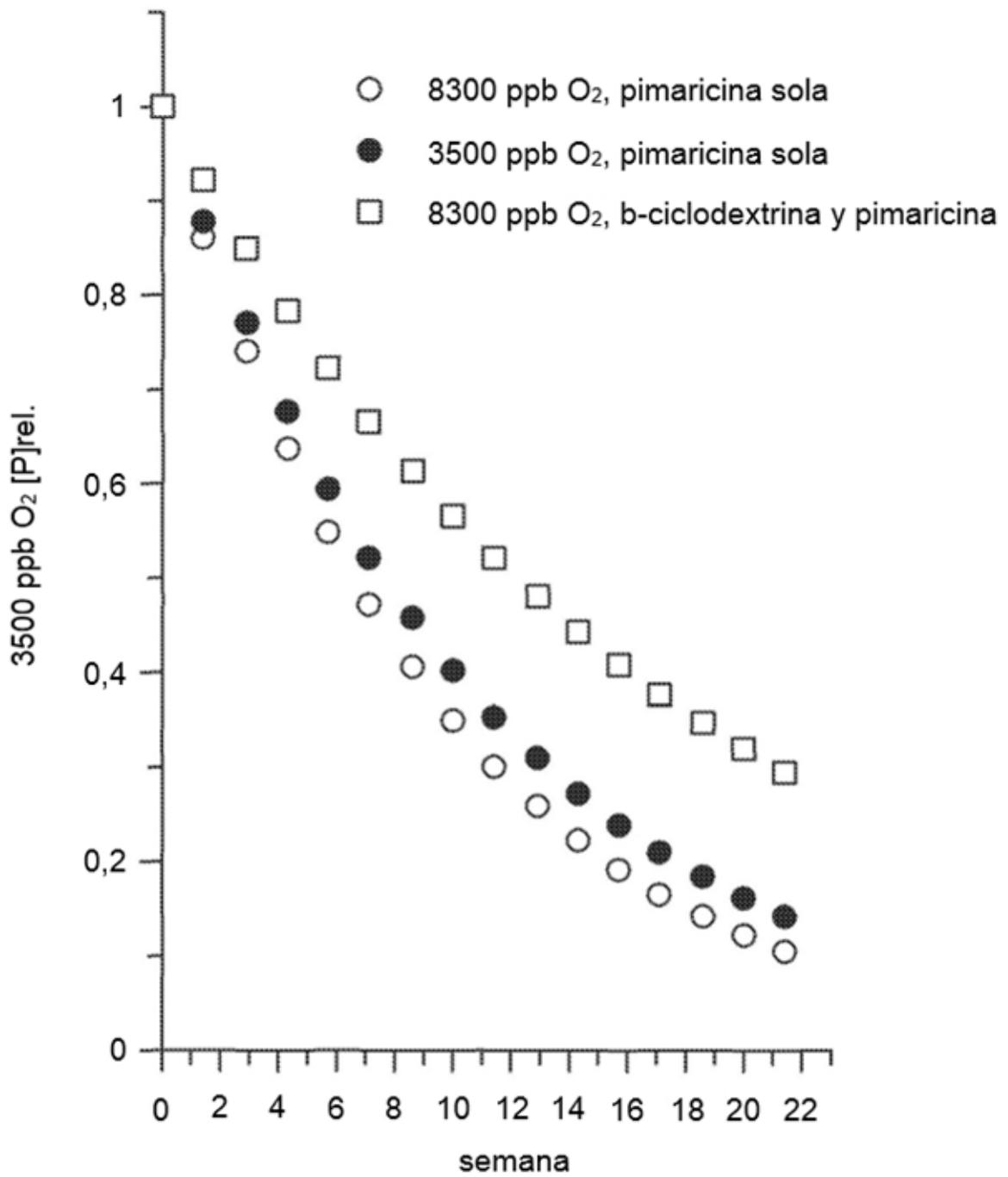


FIG.3

- Conc. inicial de pimaricina = 13 mg/l
- Conc. inicial de pimaricina = 25 mg/l
- ▲— % de muestras deterioradas, conc. inicial de pimaricina 13 mg/l

ninguna de las muestras que contienen 25 mg de pimaricina por litro se deterioró (datos no mostrados)

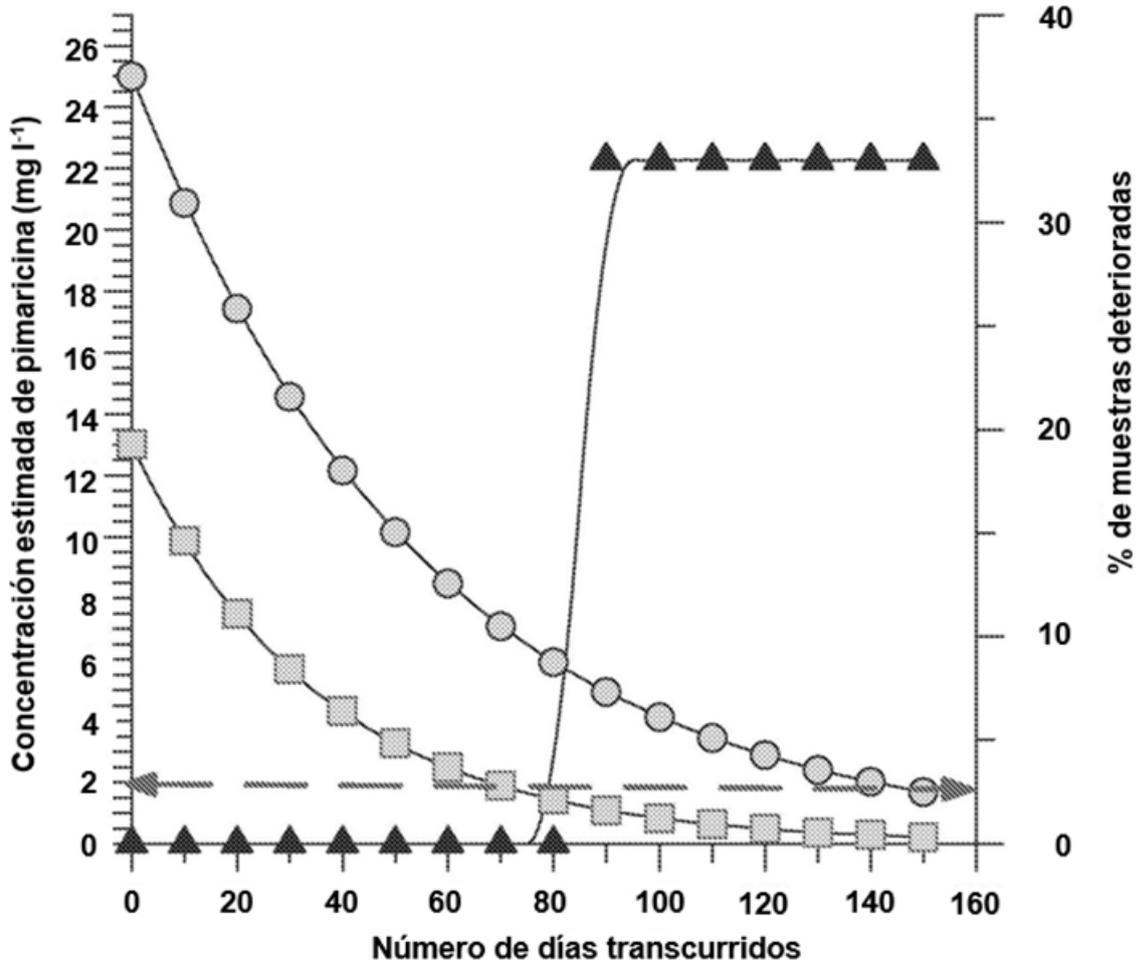


FIG.4

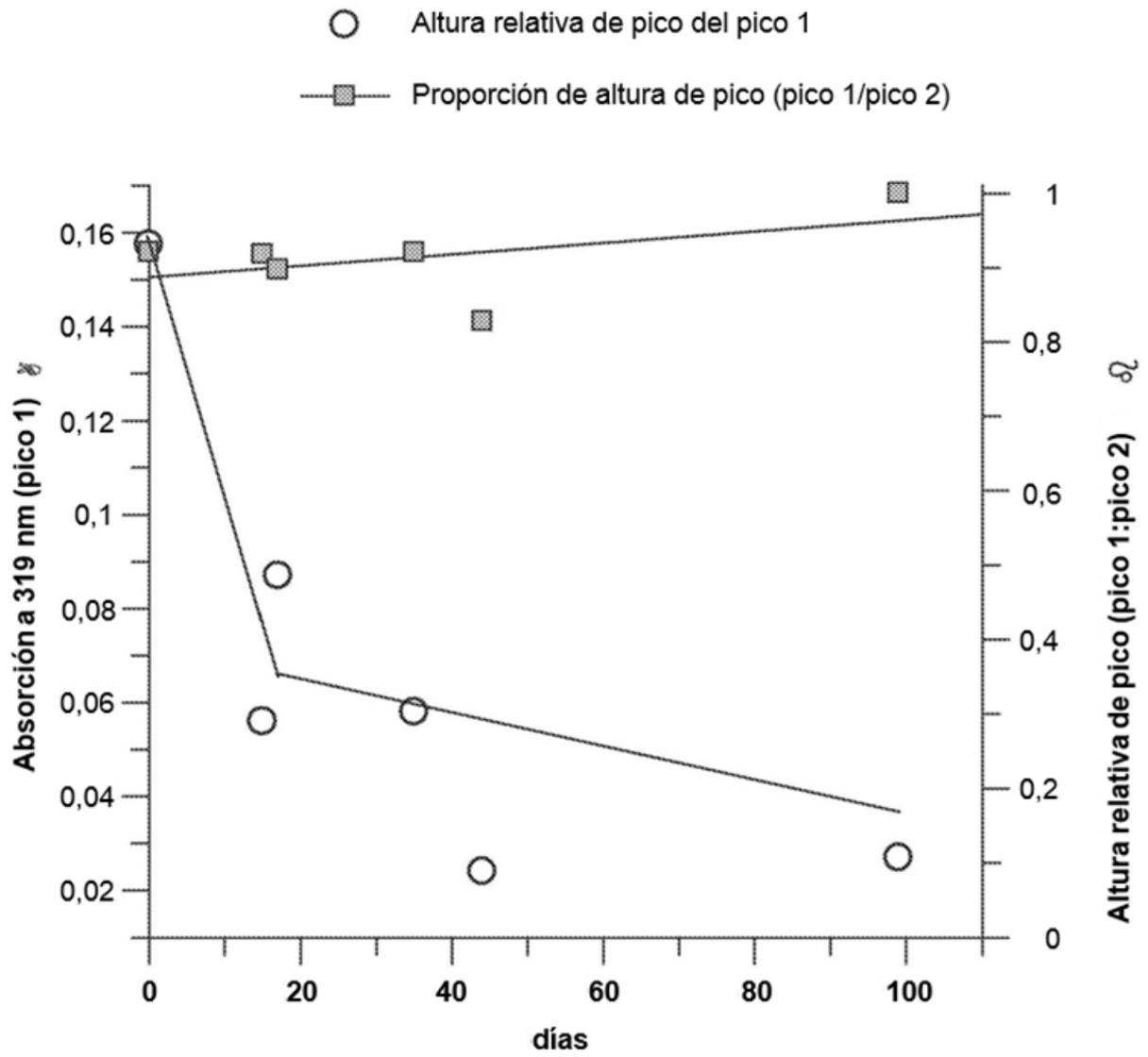


FIG.5

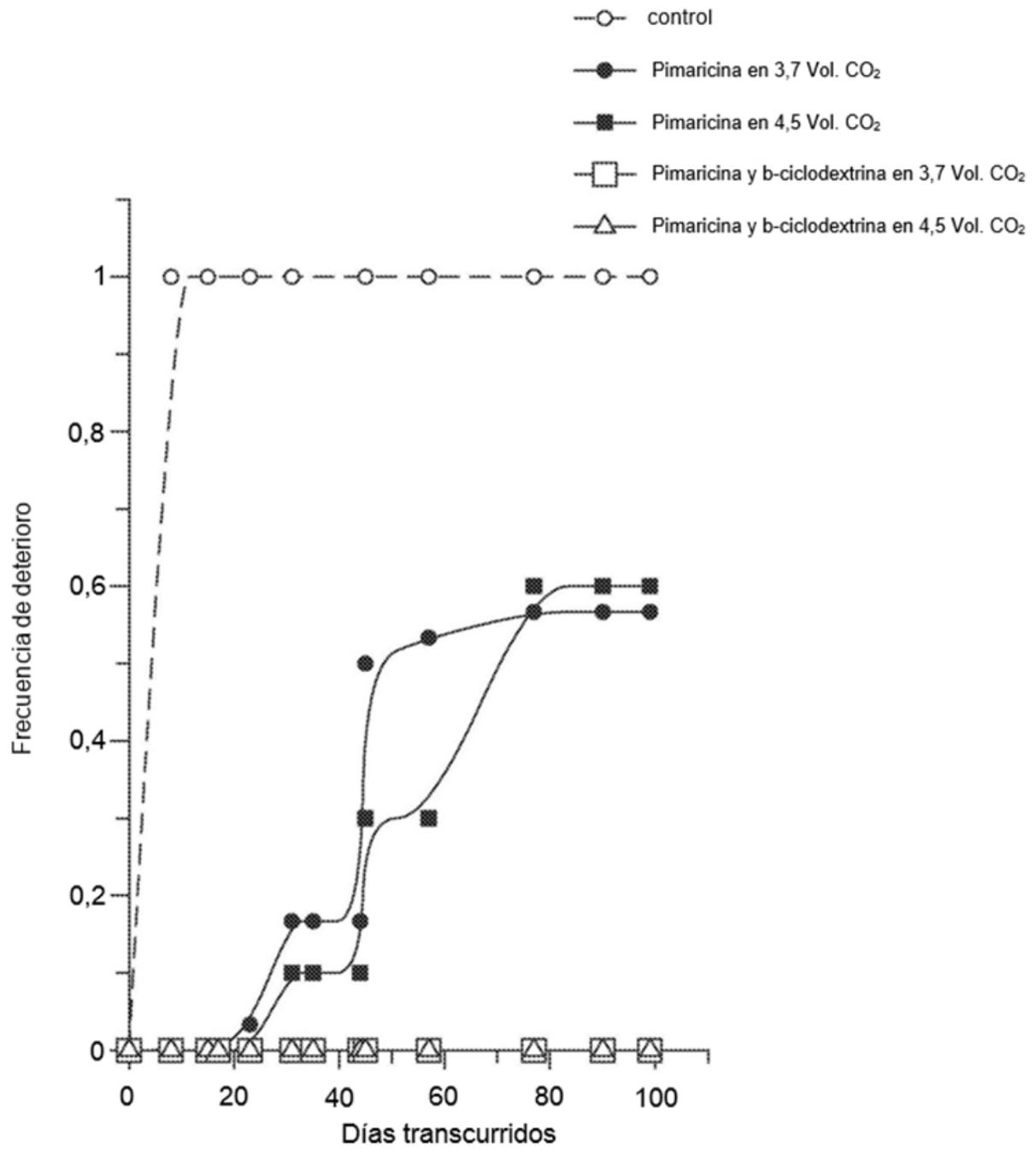


FIG.6