

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 178 975**

21 Número de solicitud: 200101607

51 Int. Cl.7: **A23L 2/02**  
A23L 2/38  
A23L 1/304

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **29.06.2001**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **01.01.2003**

Fecha de la concesión: **25.02.2004**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:  
**23.12.2003**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **01.04.2004**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**01.04.2004**

73 Titular/es: **Universitat de Les Illes Balears**  
**Campus Univ. Cr. Valldemosa, Km. 7,5**  
**Edf. Mateu Orfila**  
**07071 Palma de Mallorca, Illes Balears, ES**

72 Inventor/es: **Pons Biescas, Antoni;**  
**Aguilo Pons, Antoni;**  
**Tur Mari, Josep Antoni;**  
**Tauler Riera, Pedro;**  
**Piña Florit, Antoni y**  
**Cases Porcel, Nuria**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

54 Título: **Bebida isotónica energética y procedimiento de obtención.**

57 Resumen:

Bebida isotónica energética y procedimiento de obtención.

Enriquecida con nutrientes antioxidantes, principalmente liposolubles, fibra y determinados oligoelementos, vitaminas hidrosolubles y que comprende leche de almendras. El procedimiento de obtención de dicha bebida comprende una primera etapa de escaldado de almendras; una segunda etapa de trituración; una tercera etapa en la que se adicionan zumos de frutas o infusiones; una cuarta etapa en la que se esteriliza o pasteuriza la mezcla; una quinta etapa en la que se corrige la pérdida de nutrientes y una última etapa en la que se ajusta el pH y la osmolalidad.

ES 2 178 975 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

## DESCRIPCIÓN

Bebida isotónica energética y procedimiento de obtención.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una bebida isotónica energética que contiene leche de almendras junto con otros ingredientes como zumos de frutas o infusiones y otros componentes como oligoelementos, vitaminas, etc. y a su procedimiento de obtención.

10 **Antecedentes de la invención**

El agua es la sustancia básica de todos los procesos metabólicos del cuerpo humano. Hace posible el transporte de metabolitos (necesario para el crecimiento y la producción de energía) mediante la circulación y el intercambio de nutrientes y productos finales del metabolismo entre los órganos y el medio externo. El equilibrio hídrico está regulado mediante hormonas y por la presencia de electrolitos, especialmente sodio y cloruro en el exterior de las células, y magnesio y potasio en el interior.

El agua por sí sola es capaz de atravesar libremente las membranas celulares. La ósmosis se define como el paso de agua de una región de baja concentración de soluto a una región con una concentración mayor. El objetivo último con que se realiza este cambio de agua es el de equilibrar las dos concentraciones de soluto. En el ser humano, el trasvase de líquidos corporales se realiza para normalizar los líquidos extracelulares aproximadamente a 300 mOsm (*isotonicidad*).

Un Osmol se define como el número de Avogadro de partículas. Así, un mol de glucosa también es un osmol. Si un mol de NaCl se disociara completamente, se producirían 2 osmoles de partículas: 1 osmol de Na<sup>+</sup> y 1 osmol de Cl<sup>-</sup>. Un miliosmol (mOsm) es 10<sup>-3</sup> osmoles. Las unidades más comunes de concentración son: osmolaridad, osmoles de partículas de soluto por litro de solución y osmolalidad, osmoles de partículas de soluto por kilogramo de disolvente puro. En realidad, la mayoría de solutos no se disocian completamente por lo que se debería definir la osmolalidad como:

$$\text{Osmolalidad} = \text{osmol/kg H}_2\text{O} = \phi n C$$

donde:

$\phi$ : El coeficiente osmótico, que determina el grado de disociación

n: El número de partículas en que puede disociarse la molécula

C: La concentración molal de la solución

Un *mOsm/kg* es un *mmol/kg* en unidades del S.I.

Aparte de la concentración de soluto, también la presión arterial ejerce un importante papel en el intercambio de líquidos. Es la presión arterial, junto con los efectos osmóticos, la que determina la proporción en la que el agua abandona la circulación para entrar en los tejidos, o entra en el torrente sanguíneo desde los tejidos.

La ingesta diaria de alimentos normalmente suministra cantidades de sodio, cloruro y potasio mucho más altas que las necesidades mínimas para un adulto. Sin embargo, pueden verse afectados los niveles plasmáticos de electrolitos en el caso de pérdidas sustanciales, como durante una diarrea aguda o una sudoración intensa y prolongada. En estos casos, se suele aconsejar la inclusión de electrolitos en las soluciones de rehidratación.

La grasa es un importante sustrato energético, pero su ingestión oral puede causar algunos problemas ya que es uno de los potentes inhibidores del vaciado gástrico y su proceso de absorción es lento. Sin embargo, los triglicéridos de cadena media o TCM, parece ser que no inhiben el vaciado gástrico al mismo nivel que lo hacen las grasas. La ingestión de TCM resulta en la elevación de ácidos grasos en plasma, lo cual podría conducir a un aumento de la oxidación grasa y reducción de la utilización de carbohidratos, ahorrando glucógeno muscular. Investigaciones recientes indican que las bebidas que contienen tanto TCM como maltodextrinas producen un vaciado gástrico más rápido que las bebidas que contienen sólo maltodextrinas.

La suplementación de la dieta con sustancias minerales y vitaminas en aquellos individuos sanos que consuman una dieta bien equilibrada, que contenga cantidades suficientes de carne, fruta, verduras, cereales y productos de grano integral, en general no producirá un efecto beneficioso. No obstante, y debido a diversos factores, la dieta de los atletas sometidos a entrenamiento intensivo resulta a menudo desequilibrada. La ingesta de sustancias minerales depende en gran medida de la selección de los alimentos y de la ingesta cuantitativa de los mismos; por lo que se dan circunstancias en las que un suplemento es deseable, al igual que en cualquier situación en que los atletas quieren abstenerse de ingerir una dieta normal, o durante períodos de ingesta limitada de alimentos coincidentes con un entrenamiento intensivo, especialmente en mujeres, en participantes de deportes con categorías de peso y en atletas

vegetarianos, en los que se ha observado el consumo de dietas pobres en micronutrientes. Resulta recomendable la adición de sustancias minerales a productos y comidas preparadas y diseñadas para reemplazar a las comidas habituales durante competiciones de hiperresistencia, como el triatlón, competiciones de resistencia que se prolongan a lo largo de varias jornadas, y escalada de alta montaña. No obstante, los niveles no deberían superar los recomendados como seguros en la ingesta diaria.

La población sana (incluidos los atletas) presenta a menudo una ingesta pobre de hierro, zinc, cobre y cromo. Estas bajas ingestas pueden dar lugar a unos bajos niveles de oligoelementos, lo que puede verse exacerbado por las pérdidas inducidas por el ejercicio físico en el sudor y en la orina, así como por los aportes bajos y el aumento de las pérdidas provocado por el alto consumo de hidrocarburos de los atletas, especialmente durante las competiciones de resistencia.

Los efectos de las almendras sobre la salud de las personas son múltiples. Por una parte, su elevado contenido en nutrientes esenciales (minerales, vitaminas, aminoácidos y ácidos grasos) permite cubrir parte de los requerimientos diarios de estos nutrientes. El elevado contenido de ácido oleico, ácido graso mayoritario que permite una relación favorable de ácidos grasos monoinsaturados y saturados, además del moderado y equilibrado contenido en ácidos grasos poliinsaturados y las elevadas cantidades de vitamina E, permiten que su consumo genere efectos beneficiosos para la salud. Todos estos efectos hacen de la almendra que sea un alimento con alto valor nutricional y biológico, así como una fuente de elevada calidad de lípidos dietéticos y de fibra. La composición nutricional de la almendra se conoce desde hace tiempo, encontrándose en numerosas publicaciones y bases de datos. Normalmente las diferentes fuentes bibliográficas suelen coincidir en cuanto a la composición atribuida a la almendra; sin embargo, existen discrepancias respecto al efecto que produce el tostado sobre su valor nutricional. En general se considera que la *almendra es un alimento con alto contenido energético, de proteínas, grasas, minerales y vitaminas*. Es destacable su contenido en arginina, un aminoácido que parece desempeñar un importante papel en los procesos asociados con la dinámica del sistema cardiovascular. Además es un fruto seco rico en calcio, hierro, magnesio, fósforo, zinc y cobre, así como de vitaminas, particularmente vitamina E, B<sub>2</sub>, niacina y biotina. También presenta un porcentaje elevado de ácidos grasos esenciales y de fibra.

Las almendras presentan un importante contenido de vitamina E, la cual es destacable por su carácter antioxidante, evitando así la formación de radicales libres, que provocan mutaciones, distorsionan los fosfolípidos de membranas y dañan la estructura de éstos. La actividad física intensa produce una situación de estrés oxidativo que se puede compensar con un aumento del consumo de vitamina E, tal como hemos puesto en evidencia en estudios de intervención suplementando la dieta con un complejo de vitamina E, vitamina C y beta-caroteno. Las almendras tienen un elevado contenido de ácidos grasos monoinsaturados, siendo el ácido oleico el mayoritario. El ácido oleico es considerado un ácido graso beneficioso cuando sustituye las grasas saturadas, por su efecto depresor del colesterol plasmático. La elaboración de productos a partir de almendra es muy extensa y abarca prácticamente todo tipo de alimentos, desde salsas, dulces, sopas, postres, entrantes, aperitivos, etc. La oxidación de las grasas es uno de los principales procesos de deterioro de alimentos, provocando cambios de aroma, sabor, gusto, valor nutricional, consistencia y apariencia. La reacción de oxidación de los ácidos grasos insaturados es una reacción en cadena, mediatizada por radicales libres y que puede iniciarse por multitud de causas. Entre ellas, la acción de la lipoxigenasa, una enzima presente en la almendra cruda y que cataliza la formación de hidroperóxidos a partir de ácidos grasos poliinsaturados y oxígeno. La actividad de esta enzima es causa de deterioro de alimentos grasos como la sobrasada de Mallorca (Pons, Palou, Oliver, 1998, Utilización de anticuerpos contra la lipoxigenasa (EC 1.13.11.12) en alimentos o en sus ingredientes, Patente 009800615/0) y su desactivación produce un retraso en el inicio del proceso de oxidación de las grasas. No se conoce la dinámica de este enzima durante la maduración de la almendra ni su posibilidad de desactivación.

La leche de almendra es un producto de origen muy antiguo, una bebida con un elevado carácter tradicional en la cultura balear. Los ingredientes básicos de la receta son almendra, azúcar y agua, junto con diferentes aromatizantes. A continuación, se presenta una receta obtenida de un libro que data de principios del siglo pasado, Valsecchi, P. "El Moderno Destilador-Licorista", Barcelona 1928. Se trata de un producto que tiene por nombre "Jarabe de almendras u horchata almendrada, perfeccionado por Henry y Guivourt". La composición, referida a los ingredientes utilizados, es de 16 partes de almendras dulces, 5 partes de almendras amargas, 96 partes de azúcar, 1 parte de goma arábiga, 8 partes de agua de azahar doble y 52 partes de agua pura.

La preparación se resume de la siguiente manera: "Tómense almendras ya mondadas de la película y secas; se machacan en mortero de mármol con 20 partes de azúcar, se divide luego esta pasta en 6 u 8 partes, a fin de que machacándola separadamente resulte un polvo finísimo, que se disuelve en 52 partes de agua pura; después se cuele por fuerte presión. Se añade al líquido el resto del azúcar y la goma, se calienta la masa al baño María, agitando para que se diluya bien; cuélese por tela y añádese al líquido obtenido el agua de azahar, revuélvase bien para impedir la formación de la película oleosa. La añadidura de la goma tiene por objeto impedir que el jarabe se separe con el reposo. Este jarabe será más dulce y nutritivo según sea la goma que se emplee".

### Descripción de la invención

La presente invención se refiere a una bebida isotónica energética enriquecida con nutrientes antioxidantes, principalmente liposolubles, fibra y determinados oligoelementos y vitaminas hidrosolubles caracterizada por el hecho que comprende leche de almendras.

La presente invención también se refiere a un procedimiento de obtención de una bebida isotónica energética

## ES 2 178 975 B1

basada en leche de almendras que comprende las siguientes etapas esenciales:

- a) Desactivación de la lipoxigenasa presente en almendras.
- 5 b) Trituración de almendras.
- c) Adición de zumos o infusiones o concentrados de infusiones de té y de otras plantas medicinales.
- d) Esterilización o pasteurización de la mezcla.
- 10 e) Corrección la pérdida total o parcial de determinados nutrientes.
- f) Ajuste del valor de osmolalidad y de pH.

15 El procedimiento de la presente invención disminuye la presencia de causas responsables del inicio de la peroxidación de las grasas. La lipoxigenasa es causa del inicio de la peroxidación de las grasas y está presente en la almendra. Cuanto menor sea la actividad lipoxigenasa presente en la bebida, más tiempo tardará en iniciarse el proceso de peroxidación de las grasas.

20 Mediante la inactivación de la lipoxigenasa por escaldado de las almendras, proceso que también puede servir para el pelado de las mismas, se consigue disminuir la peroxidación de las grasas. El escaldado puede realizarse de diferentes formas, principalmente por inmersión de las almendras en agua a 100°C dejando un tiempo de aproximadamente 10 minutos para que la temperatura del agua disminuya hasta unos 60°C, momento en el que puede producirse el pelado de las almendras, desechando la piel marrón y utilizando el cotiledón blanco para continuar el proceso de elaboración de la bebida.

25 Opcionalmente, se seleccionan almendras con el grado adecuado de maduración, en función del nivel de actividad lipoxigenasa presente, observando que puede variar la evolución de la enzima con la maduración según la variedad y el sistema de cultivo. En los almendros cultivados en regadío, la maduración del fruto produce una disminución de la actividad lipoxigenasa, de modo que cuando el fruto es aún fresco y verde presenta niveles altos de esta enzima, mientras que si está seco y maduro presenta niveles menores. En los almendros cultivados en secano, las variedades adaptadas al cultivo de secano no modifican los niveles de lipoxigenasa, en cambio las variedades adaptadas a su cultivo en regadío aumentan la presencia de la lipoxigenasa con la maduración.

35 Preferentemente, se seleccionan almendras con una actividad lipoxigenasa inferior o igual a 600  $\mu$ Kat por gramo de peso seco de almendra.

40 Una vez las almendras han sido escaldadas, y posteriormente peladas, se trituran. La trituración puede llevarse a cabo en seco y, preferentemente al vacío, hasta conseguir un polvo fino, adecuado para la fabricación de helados, o bien en húmedo, introduciendo la proporción de almendra junto a un jarabe de sacarosa o de otro azúcar en un instrumento apto para producirse el triturado. También es posible primeramente efectuar un triturado en seco para perfeccionar a continuación el triturado en húmedo con objeto de obtener un tamaño de partícula menor. El medio a utilizar para el triturado en húmedo puede ser agua potable o bien una disolución en agua de un azúcar, o de un edulcorante, o una mezcla indicada de ambos en función del contenido energético y osmolal que se desee. Tanto en el

45 triturado en seco como en el triturado en húmedo debe evitarse el aumento de la temperatura con objeto de minimizar las posibles reacciones de caramelización y de pérdida nutricional del producto. En el caso del triturado en seco, el polvo de almendra obtenido se disuelve en agua o en una de las disoluciones o jarabes mencionados anteriormente.

50 La disolución obtenida, opcionalmente, puede macerarse durante un cierto tiempo con objeto de conseguir una buena extracción del material poco soluble, aunque también es posible eludir esta maceración si se pretende minimizar el contenido de material soluble procedente de la almendra para aumentar el procedente de otros ingredientes. Al final de la maceración o inmediatamente después de la trituración se puede tamizar el líquido con objeto de eliminar material insoluble o con un tamaño de partícula molesto para el consumidor.

55 La presente invención también admite no tamizar siempre que mediante el triturado se consiga una suspensión total de la almendra.

60 La siguiente etapa consiste en el mezclado del líquido de almendra obtenido en etapas anteriores con la correspondiente cantidad de zumo de frutas seleccionado en función de su riqueza en nutrientes antioxidantes hidrosolubles, principalmente vitamina C. La cantidad de zumo de frutas añadida al líquido de almendra está en función de la osmolalidad de la mezcla. A título de ejemplo, la adición de zumo de naranja hasta una concentración final del 4% a un líquido de almendra obtenido según el procedimiento anteriormente descrito y que presenta una osmolalidad de 321 mOsmoles, proporciona una bebida cuya osmolalidad final es de 240 mOsmoles. La adición de zumo de frutas se puede efectuar a partir de frutas recién exprimidas o licuadas o bien a partir de concentrados comerciales de las mismas. Las frutas a utilizar preferentemente son las naranjas, limones, fresas, uvas con sus semillas y piel, accerolas, kiwis y también zanahorias. Asimismo, se pueden utilizar infusiones o concentrados de estas infusiones de té y de plantas medicinales como la tila, la camomila, menta, hierbabuena o canela. En todos los casos las proporciones a añadir de estos ingredientes o de sus mezclas están en función de la osmolalidad de la mezcla final.

## ES 2 178 975 B1

El procedimiento de elaboración de la bebida culmina con un proceso de esterilización, pasteurización u otro que se demuestre efectivo de cara a la higiene, salubridad y conservación del producto.

Esta última etapa puede producir una disminución en el valor nutricional de la bebida debido al efecto térmico; esta pérdida se puede corregir, parcial o totalmente, antes del envasado definitivo mediante la adición, en forma sólida o a partir de disoluciones estériles, de los correspondientes nutrientes.

De la misma manera, se ajusta la osmolalidad y pH de la bebida resultante mediante la adición de una disolución de un hidróxido cualquiera, preferiblemente hidróxido sódico.

### Ejemplos

La presente invención se ilustra mejor mediante los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitadores de su alcance, el cual viene definido única y exclusivamente por las reivindicaciones adjuntas. Así, por ejemplo las concentraciones concretas y la naturaleza de los ingredientes y aditivos descritas en los ejemplos pueden extenderse a otros y a otras concentraciones. Las variedades de almendras utilizadas y los sistemas de cultivo del almendro pueden extenderse a otras variedades y sistemas en los que se demuestre que disminuyan el contenido en lipoxigenasa. El sistema de escaldado que se especifica en los ejemplos puede extenderse a otros sistemas de pelado y de escaldado que desactiven la enzima lipoxigenasa de la almendra. La maquinaria e instrumentos que se utilizan en los ejemplos pueden variar y no son limitantes de la invención. El valor nutricional que se especifica en los ejemplos puede variar en función del uso de otros ingredientes y/o de la adición de otros nutrientes.

#### Ejemplo 1

Este ejemplo ilustra un procedimiento tipo que puede seguirse para elaborar una bebida isotónica de almendra con zumo de limón. El proceso de elaboración de la bebida consta de las siguientes etapas:

- 1.- Realizar un jarabe con azúcar, 1/4 rama de canela y el agua mineral. El jarabe se obtiene disolviendo en caliente 65 g de sacarosa en 1 litro de agua mineral comercial.
- 2.- Enfriar el jarabe a temperatura ambiente.
- 3.- Triturar 100 g de almendra pelada mediante un triturador tipo "Termomix" con un pequeño volumen del jarabe de sacarosa. El "Termomix" dispone de diferentes niveles de trituración en una escala del 1 al 12. Inicialmente triturar la mezcla 10 segundos a nivel 2 y, luego un minuto y medio a nivel 12.
- 4.- Mezclar el triturado con el restante volumen de jarabe y triturar de nuevo unos 10 segundos a nivel 2.
- 5.- Enfriar a temperatura ambiente.
- 6.- Macerar durante 24 horas en frío (aproximadamente a 4°C).
- 7.- Añadir 15ml de zumo de limón recién exprimido.
- 8.- Agitar la mezcla para uniformizar los ingredientes.
- 9.- Tamizar el fluido a través de una estameña (pañó de hilo con malla amplia).
- 10.- Pasteurizar la leche de almendra: 20 minutos en baño de agua a ebullición.

Mediante este procedimiento se consigue una bebida cuyo valor de osmolalidad es de 275 mOsm/kg. La determinación de osmolalidad se realiza mediante *The Advanced(tm) Micro-Osmometer Model 3MO*. No se requiere una preparación especial de la muestra; los fluidos del cuerpo como la sangre, suero o plasma pueden ser usados directamente. Nosotros utilizamos directamente la bebida para efectuar la determinación de la osmolalidad. Se pipetea 20  $\mu$ l de muestra con pipeta automática y se introduce la punta en el interior de la celda de congelación. No se debe inyectar el contenido de la pipeta en el interior de la cámara, simplemente mantener la punta de la pipeta con la muestra en el interior hasta que la prueba haya concluido. Una vez apretado el botón de inicio del análisis, el osmómetro completará automáticamente la determinación llevando al punto de congelación a la muestra. El resultado del análisis aparecerá en pantalla, en unidades de mOsm/kg.

#### Ejemplo 2

Este ejemplo ilustra un procedimiento tipo que puede seguirse para elaborar una bebida isotónica de almendra con zumo de naranja. Asimismo ilustra el hecho de que la mezcla de ingredientes produce un valor de osmolalidad inferior al esperado.

El procedimiento seguido es el mismo que el descrito en el ejemplo 1 con la diferencia que en este caso, en lugar de introducir el zumo de limón se introduce 75ml de zumo de naranjas recién exprimidas.

## ES 2 178 975 B1

La medida de la osmolalidad de la bebida final según el procedimiento descrito en el ejemplo 1 da un valor de 246 mOsm/kg. Este valor admite la adición de ClNa hasta una concentración final de 20 mmoles/kg. El valor de osmolalidad del jarabe con almendra obtenido después de macerar (punto 6) según el procedimiento descrito en el ejemplo 1 es de 301 mOsm/Kg, mientras que el valor de osmolalidad de la bebida final a la que ya se le ha añadido el zumo de naranja es de 246 mOsm/kg. En el proceso de mezclado de los diferentes ingredientes se ha producido un cambio del pH del producto final que puede haber alterado el valor de osmolalidad esperado.

### Ejemplo 3

Este ejemplo ilustra el cambio de pH que se produce al mezclar los diferentes ingredientes según el procedimiento descrito en el ejemplo 1. Asimismo ilustra cómo un cambio de pH puede afectar el valor de la osmolalidad de una disolución.

Un triturado de almendra similar al descrito en el punto 1 del ejemplo 1 presenta un valor de pH de 6,6; un zumo de limón recién exprimido tiene un valor de pH de aproximadamente 2,10. La bebida final que se obtiene según el procedimiento descrito en el ejemplo 1, con una mezcla de los ingredientes de 15 ml de zumo de limón, 100g almendra, 65 g azúcar y 1 litro de agua tienen un valor de pH final de 5,2.

La mezcla de una disolución aproximadamente 0,15 N de hidróxido sódico con un valor de osmolalidad de 276 mOsm/kg con un volumen igual de una disolución de aproximadamente 0,15 N de ácido clorhídrico con un valor de 287 mOsm/kg produce una disolución de cloruro sódico cuyo valor de pH es de 11,7 y el valor de osmolalidad de 118 mOsm/kg. Mientras que si en vez de mezclar estas disoluciones entre sí las mezclamos cada una de ellas con un volumen igual de agua destilada los valores de osmolalidad medidos son los siguientes: para el caso de una dilución con agua 1:1 de la disolución inicial de ácido clorhídrico 0,15 N la osmolalidad de la mezcla es de 109 mOsm/kg; para el correspondiente caso del hidróxido sódico, el valor de la mezcla es de 111 mOsm/kg. De acuerdo con estos datos, si hubiéramos hecho una mezcla 1:1 con la disolución de clorhídrico y de sosa, la concentración de especies iónicas esperada produciría un valor de osmolalidad suma de los dos anteriores, es decir de 220 mOsm/kg. En cambio, dado que se produce una reacción de neutralización el valor de osmolalidad real obtenido es de 118 mOsm/Kg.

### Ejemplo 4

Este ejemplo ilustra cómo la selección de variedades y sistemas de cultivo permiten el enriquecimiento de la bebida con vitamina E.

Se ha determinado la concentración de vitamina E mediante un sistema HPLC de fase reversa, después de un proceso de extracción de la vitamina E de la almendra.

La extracción de la vitamina E de la almendra se ha realizado conforme al procedimiento que se expone a continuación. Se pesa en balanzas de precisión aproximadamente 0,5 g de almendra (perfectamente pelada y finamente picada). Se homogeneiza con 10ml de tampón fosfato sódico 50 mM pH 7,0. en un homogeneizador Sorvall Omni-mixer a un nivel 3 de velocidad durante 5 minutos y siempre en frío. Se pipetea 2 ml de homogenado por duplicado sobre tubos de vidrio junto con un volumen igual de etanol y se protegen éstos del contacto con la luz, rodeándolos con papel de aluminio. Se voltean los tubos durante unos 10-15 segundos y, seguidamente se añaden a uno de los tubos 4 ml de n-hexano, y al otro tubo 50  $\mu$ l de una solución de vitamina E de elevada pureza en hexano (concentración aproximada 0,6  $\mu$ g/ $\mu$ l) y 4 ml de n-hexano. Esta estrategia permitirá calcular el factor de recuperación de la extracción de vitamina E de la almendra. Los tubos se tapan y se dejan volteando durante aproximadamente 15 minutos en un agitador mecánico. Las mezclas obtenidas presentan separación en dos fases (orgánica y acuosa) y se centrifuga durante 10 minutos a 2000 g y a 4°C. A continuación, se recuperan las fases orgánicas en otros tubos de ensayo perfectamente protegidos de la luz, se repite la extracción de vitamina E con la adición de 4 ml de hexano más, y tras la centrifugación se recuperan los nuevos sobrenadantes en los mismos tubos de ensayo.

La separación y cuantificación del  $\alpha$ -tocoferol o vitamina E se realiza mediante un sistema cromatográfico HPLC de Shimadzu compuesto por los siguientes módulos: una bomba Shimadzu LC-10AD, un autoinyector Shimadzu SIL-10AXL y un detector de diodo-array Shimadzu SPD-M10A. Las condiciones cromatográficas son las siguientes: *Columna*: Nova Pack C18 (fase reversa) 3.9x150 mm. *Fase móvil*: CH<sub>3</sub>CN : THF : H<sub>2</sub>O (55:37:8). *Flujo*: 1 ml/min. *Tiempo de elución*: 5 minutos. *Detección*: espectrofotométrica a 290 nm. *Volumen de inyección*: 45  $\mu$ l.

Las determinaciones de vitamina E se han realizado en almendras de la variedad *Masbovera* y *Glorieta* cultivadas en seco en seis muestras de cada variedad. Los valores de vitamina E obtenidos son significativamente diferentes: variedad *Masbovera* 17 $\pm$ 1 mg/100g de almendra y variedad *Glorieta* 24 $\pm$ 1 mg/100g de almendra. La variedad *Masbovera* cultivada en regadío incrementa ligeramente su contenido en vitamina E hasta presentar un valor de 21 $\pm$ 1 mg/100g de almendra.

### Ejemplo 5

Este ejemplo ilustra cómo la selección de variedad y sistema de cultivo puede permitir disminuir la actividad de sistemas prooxidantes presentes en la almendra.

## ES 2 178 975 B1

La medida de la actividad lipoxigenasa se puede efectuar por el seguimiento espectrofotométrico continuo de la aparición de los dienos conjugados que absorben a 234 nm, utilizando ácido linoleico como sustrato de la reacción. Las muestras de almendras se pelan y trocean y se depositan en el recipiente del homogeneizador Sorvall Omni-mixer. La cantidad de muestra para homogeneizar es de aproximadamente 1g de almendra al que se añaden 10 ml de tampón de extracción (tampón fosfato sódico 50mM, pH 7,0). La homogeneización se realiza en un baño de agua-hielo y a un nivel de velocidad 3 durante 5 minutos. El homogenado obtenido se centrifuga durante 10 minutos, a 4°C y a 1000g. Se recoge el sobrenadante para determinar la actividad LOX.

En una cubeta de cuarzo se ponen 3 ml de tampón de la reacción (tampón fosfato sódico 200mM pH 6,5), se añaden 20 µl de homogenado y se agita. Se deposita la cubeta en el espectrofotómetro, se realiza un autocero y se añaden 20 µl de la solución de ácido linoleico concentrado (20 mg ácido linoleico y 20 mg Tween-20 en 1 ml de agua destilada); se agita enérgicamente. La medida de la absorbancia se inicia a 234 nm en un espectrofotómetro Shimadzu y con la ayuda de un programa informático, se calcula la pendiente de la reacción en el intervalo de máxima linealidad, que normalmente aparece antes de los 40 segundos después del inicio de la reacción.

La actividad lipoxigenasa se ha determinado en diferentes variedades cultivadas en regadío o en secano. Los resultados obtenidos se representan en la siguiente tabla 3.

TABLA 3

### Actividad Lipoxigenasa de la almendra

Actividad Lipoxigenasa	Tipo cultivo	Variedad Ferragnés	Variedad Masbovera	Variedad Glorieta
µkat/g almendra	regadío	473 ± 10 <sup>a</sup>	450 ± 15 <sup>a</sup>	479 ± 13 <sup>a</sup>
	secano	478 ± 13 <sup>a</sup>	529 ± 23 <sup>ab*</sup>	552 ± 19 <sup>b*</sup>
µkat/g peso seco	regadío	488 ± 11 <sup>a</sup>	467 ± 16 <sup>a</sup>	496 ± 14 <sup>a</sup>
	secano	492 ± 14 <sup>a</sup>	544 ± 24 <sup>ab*</sup>	568 ± 20 <sup>b*</sup>
µ kat/almendra	regadío	525 ± 12 <sup>a</sup>	575 ± 20 <sup>b</sup>	624 ± 17 <sup>c</sup>
	secano	540 ± 15 <sup>a</sup>	512 ± 23 <sup>a*</sup>	522 ± 18 <sup>a*</sup>

\* Significa diferencias significativas entre los tipos de cultivo (p<0,05, t-Student)

Diferentes letras implica diferencias significativas entre las variedades de almendra (p<0,05, ANOVA).

La actividad lipoxigenasa (expresada por gramo de peso seco de almendra) se ve influida por el regadío y por el tipo de variedad, siendo la respuesta frente al regadío dependiente de la variedad. La actividad LOX aumentó un 15-16% en las variedades *Glorieta* y *Masbovera* cuando eran cultivadas en secano, mientras que permanecieron inalteradas en el caso de la variedad *Ferragnés*.

Las diferencias entre variedades se manifiestan cuando son cultivadas en secano y desaparecen cuando son cultivadas en regadío. La variedad *Ferragnés* cultivada en secano presenta un perfil de actividad LOX que la hace más adecuada para evitar la oxidación de las grasas durante la elaboración de la bebida que las otras dos variedades.

#### Ejemplo 6

Este ejemplo ilustra cómo un procedimiento de escaldado permite la desactivación parcial de la actividad lipoxigenasa de las almendras. También ilustra cómo la esterilización produce la desactivación total del enzima.

La actividad lipoxigenasa se ha determinado de mismo modo al descrito en el ejemplo 5.

El procedimiento de escaldado consiste en sumergir las almendras (25 g) en agua (100 ml) a 100°C hasta que la temperatura de la mezcla llegue a unos 60°C, momento en el que se sacan las almendras. El escaldado permite el pelado de las almendras. Los valores de actividad lipoxigenasa se obtuvieron de seis muestras de almendras escaldadas con este procedimiento. Los valores de referencia de actividad lipoxigenasa de la almendra se obtuvieron simultáneamente en 6 muestras de almendras peladas mediante el uso de cuchillas y mantenidas en todo momento a temperatura ambiente. La actividad lipoxigenasa de las muestras de referencia fue de 221±7 µkat/g almendra mientras que la actividad de las muestras escaldadas 117±7 µkat/g almendra, se produce una pérdida significativa del 50% de la actividad.

La esterilización de una bebida de almendra se ha realizado al baño maría con un volumen de agua de unos 8 litros. Se introdujeron unos 6 botes de 0,5 litros de bebida de almendra, herméticamente cerrados y se llevó el conjunto a ebullición durante 20 minutos. Al cabo de este tiempo se deja enfriar hasta una temperatura aproximada de 60°C. Se determinó la actividad lipoxigenasa del contenido de los botes de bebida de almendra antes y después de este proceso de esterilizado con los siguientes resultados: 176 µkat/g almendra antes de la esterilización y no detectable después de

la esterilización.

#### Ejemplo 7

5 Este ejemplo ilustra el valor nutricional de dos bebidas elaboradas de forma similar a la descrita en el ejemplo 1 sin el tamizado señalado en el punto 9. El cálculo del valor nutricional se ha efectuado a partir de la composición promedio descrita para los ingredientes en las tablas de composición de alimentos (Mataix, J & Mañas, M “Tablas de composición de alimentos españoles” 3ª edición. Instituto de Nutrición y Tecnología de alimentos. Universidad de Granada, 1998) y de los niveles de vitamina E determinados en las almendras utilizadas según el procedimiento descrito en el ejemplo 4.

Las cantidades de los ingredientes utilizados son:

15 Bebida de almendra con zumo de naranja: 100 g de almendra, 65 g de azúcar común, 50 ml de zumo de naranjas recién exprimidas, 1 litro de agua mineral, 1/4 de rama de canela.

Bebida de almendra con zumo de limón: 100 g de almendra, 65 g de azúcar común, 15 ml de zumo de limones recién exprimidos, 1 litro de agua mineral, 1/4 de rama de canela.

20 En la tabla adjunta se presentan, además de la composición pormenorizada de nutrientes de estas bebidas, el porcentaje de las ingestas recomendadas de nutrientes que cubre la ingestión de 330 ml de estas bebidas.

25 Por lo general la ingesta de líquidos debería ser igual al recambio total de agua diario (aproximadamente 4% del peso total), esto puede verse modificado por el ejercicio físico, ritmo metabólico, pérdidas insensibles, condiciones climáticas, altitud, etc... Así, en general, para un hombre de 70 kg, se recomienda la ingesta diaria de unos 2 l/día, que deben aumentarse cuando se realiza ejercicio físico a razón de 1 ml/kcal de gasto energético (maratón 3000 kcal = 3 litros; etapa de Tour montaña 6000 kcal = 6 litros). La ingesta de dos envases de esta bebida de diseño puede representar entre un 27-28% de la ingesta de agua recomendada para una persona con actividad física moderada, y en el caso de los deportistas con sudoración abundante significaría un porcentaje menor debido a que las necesidades son proporcionales al gasto energético.

30 La tabla 4 refleja que el consumo de dos envases de esta leche de almendra, equivalente a un volumen de 660 ml, proporciona prácticamente el 100% de la *vitamina E* recomendada a ingerir diariamente y, además, en la forma químicamente aceptable para la asimilación por el organismo. Adicionalmente, la almendra posee un porcentaje importante de ácido fólico, tiamina, riboflavina, zinc, magnesio, hierro y calcio. Además, el contenido en ácidos grasos puede potenciar la absorción de las vitaminas liposolubles.

40

45

50

55

60

65

# ES 2 178 975 B1

TABLA 4

*Composición nutricional de la bebida y % Ingestas Diarias Recomendadas de Energía y Nutrientes*

Cantidades en 330 g de leche almendra	Composición con zumo limón	% IDR <sup>1</sup>	Composición con zumo naranja	% IDR <sup>1</sup>
Porción comestible	330	-	330	-
Energía (kcal)	231	7,92/9,9	228	7,92/9,9
Energía (kJ)	964	7,92/9,9	952	7,92/9,9
Proteínas (g)	5,63	10,4/13,7	5,52	10,2/13,5
Grasa (g)	15,0	-	14,5	-
Grasa saturada (g)	1,07	-	1,04	-
Grasa monoinsaturada (g)	9,24	-	8,95	-
Grasa poliinsaturada (g)	2,53	-	2,45	-
Colesterol (mg)	0	-	0	-
Carbohidratos (g)	19,5	-	19,9	-
Fibra (g)	4,02	-	3,90	-
Calcio (mg)	98,7	12,3/12,3	97,3	12,1/12,1
Hierro (mg)	1,83	18,3/10,1	1,79	17,9/9,93
Yodo (µg)	0,776	0,561/0,693	0,815	0,594/0,726
Magnesio (mg)	76,1	21,7/23,0	74,7	21,4/22,6
Zinc (mg)	2,05	13,7/13,7	2,01	13,4/13,4
Sodio (mg)	6,55	-	6,44	-
Potasio (mg)	201	-	211	-
Fósforo (mg)	144	-	141	-
Tiamina (B1) (mg)	0,129	10,7/14,3	0,132	11,0/14,7
Riboflavina (B2) (mg)	0,188	10,5/13,4	0,185	10,3/13,2
Piridoxina (B6) (mg)	0,030	1,65/1,85	0,033	1,83/2,06
Cobalamina (B12) (µg)	0	0	0	0
Ac. Ascórbico (C) (mg)	2,15	3,56/3,56	5,44	9,08/9,08
Ac. Fólico (µg)	27,3	13,7/13,7	31,1	15,5/15,5
Niacina (mg Eq niacina)	1,49	7,46/9,93	1,49	7,46/9,93
Vitamina A (µg Eq retinol)	0,086	0,010/0,010	1,36	0,135/0,172
Vitamina D (µg)	0	0	0	0
Vitamina E (mg)	5,61	46,8/46,8	5,45	45,4/45,4

1.- Ingestas recomendadas de energía y nutrientes para la población española (revisadas 1998). Las necesidades energéticas están calculadas para una actividad moderada. Primeros valores hacen referencia a varones y el segundo a mujeres con edades comprendidas entre 20 y 39 años.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de obtención de una bebida isotónica energética enriquecida con nutrientes antioxidantes, principalmente liposolubles, fibra y determinados oligoelementos y vitaminas hidrosolubles, caracterizado por el hecho de que comprende las siguientes etapas:
- 10 a) Desactivación de la lipoxigenasa presente en almendras por inmersión de las almendras en agua a 100°C durante aproximadamente 10 minutos para que la temperatura del agua disminuya hasta unos 60°C.
- 15 b) Trituración de almendras.
- c) Adición de zumos o infusiones o concentrados de infusiones de te y de otras plantas medicinales.
- 20 d) Esterilización o pasteurización de la mezcla.
- e) Corrección la pérdida total o parcial de determinados nutrientes.
- f) Ajuste del valor de osmolalidad y de pH.
- 25 2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho que se seleccionan almendras entre las variedades que presenten una actividad lipoxigenasa inferior o igual a 600  $\mu$ Kat por gramo de peso seco de almendra.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho que dicha trituración se lleva a cabo en seco y/o húmedo.
- 30 4. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho que la temperatura durante la trituración es inferior a 15°C.
5. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho que dicha trituración se lleva a cabo en ausencia de oxígeno.
- 35 6. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho que posteriormente a la trituración se lleva a cabo la maceración de las almendras.
7. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho que posteriormente a la maceración se lleva a cabo la tamización de la mezcla.
- 40 8. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho que la corrección de la pérdida total o parcial de determinados nutrientes se lleva a cabo por adición de una disolución esterilizada e hipotónica, hipertónica o isotónica de dichos nutrientes.
- 45 9. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho que el ajuste de pH y osmolalidad se lleva a cabo por adición de una disolución de un hidróxido cualquiera, preferiblemente hidróxido sódico.
- 50 10. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho que se seleccionan almendras entre las variedades que contienen una cantidad igual o superior a 17 mg de vitamina E por cada 100 gramos de almendra seca.
- 55 11. Bebida isotónica energética obtenible mediante un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
- 60
- 65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 178 975

② Nº de solicitud: 200101607

③ Fecha de presentación de la solicitud: 29.06.2001

④ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: A23L 2/02, 2/38, 1/304

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 20010002269 A1 (ZHAO, I.G.) 31.05.2001, página 19, ejemplo 14.	1
A	JP 54-138135 A (KIBUN KK) 26.10.1979 (resumen) [en línea] [recuperado el 22.11.2002]. Recuperado de EPO WPI Database	2,4,8
A	WO 0101799 A1 (SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A.) 11.01.2001	2
A	ES 2095806 A1 (TURRONES Y ESPECIALES VIAR S.A.) 16.02.1997	2,11
A	CN 1067358 A (FENNING MILK PRODUCTS FACTORY) 30.12.1992 (resumen) [en línea] [recuperado el 22.11.2002]. Recuperado de EPO EPODOC Database	4
A	ES 2116916 A1 (NECTINA, S.A.) 16.07.1998	
A	JP 55-159774 A (KAWADA TOYOFUMI) 12.12.1980 (resumen) [recuperado el 22.11.2002]. Recuperado de EPO PAJ Database	

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

29.11.2002

Examinador

Asha Sukhwani

Página

1/1