

(11) Número de Publicação: **PT 865738 E**

(51) Classificação Internacional:
A23L 3/3463 (2006.01) **C12P 19/62**
(2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 1998.03.11	(73) Titular(es): DSM IP ASSETS B.V.	
(30) Prioridade(s): 1997.03.14 EP 97200764	HET OVERLOON 1 6411 TE HEERLEN	NL
(43) Data de publicação do pedido: 1998.09.23	(72) Inventor(es):	
(45) Data e BPI da concessão: 2007.05.30 032/2007	JACOBUS STARK	NL
	FERDINAND THEODORUS JOSEPH VAN RIJN	NL
	EDITH MAGDA LUCIA GEIJP	NL
	(74) Mandatário:	
	MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA	
	RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **COMPLEXO NATALMICINA- PROTEÍNA SOLÚVEL.**

(57) Resumo:
COMPLEXO NATALMICINA- PROTEÍNA SOLÚVEL.

RESUMO

"COMPLEXO NATAMICINA-PROTEÍNA SOLÚVEL"

A presente invenção refere-se a um complexo compreendendo natamicina complexada com uma ou mais proteínas, aos processos para a produção do mesmo e a composições que o compreendem. A presente invenção refere-se ainda à utilização destes complexos como um tratamento antimicobacteriano preventivo para produtos naturais e a um método para prevenir a infecção de um produto natural por micobactérias, compreendendo o referido método o tratamento do produto natural com o referido complexo.

DESCRIÇÃO

"COMPLEXO NATAMICINA-PROTEÍNA SOLÚVEL"

A presente invenção refere-se à preparação de composições que compreendem natamicina e à utilização de tais composições para tratar alimentos, tais como queijos e salsichas, ou produtos agrícolas, tais como frutos, grãos e sementes. São também divulgados os referidos produtos tratados com composições da invenção.

Há mais de 20 anos que a natamicina é utilizada para prevenir o crescimento de fungos em queijos e salsichas.

Os queijos são tratados por imersão numa suspensão de natamicina em água, ou mediante revestimento com uma emulsão de um polímero em água, principalmente acetato de polivinilo. As salsichas são principalmente tratadas por imersão ou por revestimento por aspersão com uma suspensão de natamicina em água. Normalmente, as suspensões aquosas para tratamentos de imersão contêm 0,1% a 0,2% em p/v de natamicina, enquanto as emulsões poliméricas para propósitos de revestimento contêm 0,01% a 0,05% p/v de natamicina.

Estes tratamentos podem ser altamente eficazes na prevenção do crescimento de fungos na superfície dos queijos e salsichas. No entanto, devido à baixa solubilidade da natamicina, as espécies de bolores, as quais são menos sensíveis à natamicina, por vezes não são completamente inibidas. Logo, pode ainda ocorrer alguns estragos provocados por fungos. Exemplos de espécies de fungos que

são mais tolerantes à natamicina são: *Verticilium cinnabarinum*, *Botrytis cinerea* e espécies *Trichophyton*. Espécies mais tolerantes podem também ser encontradas entre as do género *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. Um exemplo de uma tal espécie que por vezes causa problemas de bolores na indústria de queijos é a *Penicillium discolour*.

Devido à baixa solubilidade da natamicina, um produto alimentar tratado com este antimicótico será protegido contra o crescimento de fungos durante um período de tempo mais longo. Apenas a natamicina, que está em solução, estará disponível para exercer actividade anti-fúngica.

A natamicina possui uma CIM (Concentração Inibitória Mínima) menor do que 10 ppm para a maioria dos fungos que se desenvolvem nos alimentos, enquanto a sua solubilidade em água é de 30 a 50 ppm [Brik, H.; "Natamycin" *Analytical Profiles of Drug Substances* 10, 513-561, (1981)]. Após muitos anos de utilização contínua deste antimicótico nunca foram encontrados fungos resistentes à natamicina [De Boer, E.; Stolk-Horsthuis, M.; "Sensitivity to natamycin (pimaricin) of fungi isolated in cheese warehouses", *J. Of Food Prot.* 40, 533-536, (1977)]. Sob condições normais, a natamicina protegerá completamente os produtos alimentares, tais como os queijos, contra a destruição por fungos durante um curto período de tempo. No entanto, algumas vezes, a quantidade de fungos presente no meio envolvente é elevada, por exemplo numa fábrica de queijos, de tal forma que, a fracção dissolvida de natamicina é insuficiente para prevenir o crescimento de fungos no queijo, ou a produção ou as condições de armazenamento nas fábricas são particularmente favoráveis ao crescimento de fungos. Um exemplo de um factor importante, o qual aumenta o

crescimento de fungos, é o controlo insuficiente da humidade relativa.

Em tais casos, as espécies bolores mais tolerantes desenvolvem-se nos produtos tratados com natamicina.

A destruição por bolores pode causar consideráveis perdas económicas e é necessário um sistema antifúngico mais eficaz para proteger os produtos alimentares, tais como queijos, contra a destruição provocada pelas espécies bolores mais tolerantes à natamicina.

A Patente Europeia EP 0 466 038 divulga complexos polieno antifúngicos dispersíveis em água e processos para a sua preparação.

O complexo de anfotericina B com desoxicolato possui possíveis efeitos secundários tóxicos, sendo o mais grave a nefrotoxicidade. Estes efeitos secundários tóxicos podem estar relacionados com a sua fraca solubilidade em água. Os complexos desvendados oferecem a vantagem de libertarem rapidamente o agente antifúngico para dentro da água sem redução da sua actividade.

A presente invenção refere-se a um processo cujo objectivo é a melhoria da actividade da natamicina versus fungos e às composições preparadas de acordo com o referido processo. Particularmente, tais composições podem ser úteis para combater bolores e leveduras, os quais são normalmente relativamente menos sensíveis à acção da natamicina.

No caso dos fungos com susceptibilidade à natamicina relativamente baixa, a solubilização e a difusão podem

possuir um efeito mais limitativo sobre a sua actividade antifúngica. Quando uma preparação fungicida convencional contendo natamicina é utilizada, no estado de equilíbrio, a quantidade média de natamicina dissolvida pode descer abaixo da concentração eficaz porque a eliminação não será adequadamente compensada pela dissolução e difusão do composto antifúngico.

A modificação da forma polimórfica de compostos antifúngicos à base de polieno, tais como a natamicina, podem também conduzir a uma actividade melhorada destes compostos contra as espécies menos susceptíveis [Pedido de Depósito da Patente Europeia N° 670 676, (1995)]. Os exemplos de tais formas modificadas são os solvatos de natamicina, tais como solvato de metanol e modificações cristalinas de natamicina. A actividade dos fungicidas à base de polieno pode também ser aumentada por conversão do composto num seu sal de um metal alcalino-terroso, tais como os sais de cálcio e bário.

Um outro método para aumentar a actividade dos fungicidas à base de polieno é o de primeiro dissolver o composto antifúngico num solvente e em seguida incorporar o fungicida dissolvido numa composição aquosa (Pedido de Depósito da Patente Europeia N° 670 676). Exemplos de sistemas solventes adequados são álcoois de baixo peso molecular tais como metanol, etanol e propanol; glicerol e glicol; metoxietanol e etoxietanol; ácido acético glacial e soluções alcalinas e ácidas aquosas; também podem ser utilizados agentes de solubilização adequados.

Estes antibióticos à base de polieno modificado podem também ser aplicados em substâncias veiculares através de

métodos bem conhecidos; e.g. por técnicas de revestimento por pulverização utilizando uma solução da composição antifúngica numa substância veicular ou por evaporação do solvente a partir de uma mistura de uma solução do antifúngico com uma substância veicular.

A solução do composto antifúngico pode ser incorporada dentro da composição final adicionando a solução à preparação ou vice versa.

O aumento da actividade pode ser alcançado através da melhoria da disponibilidade do composto antifúngico como resultado duma dissolução melhorada (EP 670 676). A solubilidade em água pode ser aumentada utilizando condições alcalinas ou acídicas. A solubilidade pode também ser aumentada mediante a utilização de solventes. No entanto, é bem sabido que, a natamicina dissolvida é rapidamente decomposta sob tais condições (Brik, *vide supra*). Além disso, a natamicina dissolvida é conhecida por ser menos estável em comparação com a forma cristalina. A natamicina, por exemplo, pode ser desactivada por decomposição através da acção da luz ou por hidrólise.

Pode concluir-se que todos os métodos conhecidos para aumentar a actividade dos fungicidas à base de polieno por aumento da biodisponibilidade conduzem a uma decomposição rápida do fungicida à base de polieno.

Inesperadamente, verificou-se que a actividade da natamicina contra bolores e leveduras pode ser marcadamente aumentada se a natamicina for complexada com um composto adequado.

Além disso, verificou-se que os complexos descritos neste documento são muito estáveis sob condições aquosas, e.g., revestimento de queijo ou uma solução para imersão/pulverização.

A presente invenção fornece um complexo, o qual compreende natamicina complexada a uma ou mais proteínas ou aminoácidos, quando presente em água, e não produz cristais visíveis sob observação com um microscópio com uma ampliação de 400x.

Vantajosamente, este complexo não perde substancialmente actividade por um período de 60 dias. Em geral, a proporção de natamicina para a quantidade total de proteínas ou aminoácidos é de 10.000:1 a 1:10, preferencialmente esta proporção está compreendida entre 100:1 a 1:1.

Preferencialmente, pelo menos uma das proteínas é uma proteína do leite, mais preferencialmente é uma proteína do soro, caseína ou caseinato.

O complexo pode ser produzido segundo o seguinte método:

- (1) dissolver a natamicina num líquido aquoso por aumento ou redução do pH, tal como, mediante a utilização de métodos bem conhecidos;

- (2) misturar a natamicina (dissolvida) com o composto adequado (ou agente complexante);

- (3) aderir a natamicina ao composto adequado mediante ajuste do pH para o nível requerido, utilizando métodos bem conhecidos; e opcionalmente

- (4) isolar o complexo de natamicina aderido ao composto adequado a partir da fracção líquida utilizando métodos conhecidos.

O complexo pode também ser produzido utilizando o seguinte método:

(1) dissolver a natamicina num sistema solvente adequado;

(2) aderir a natamicina ao composto adequado mediante mistura da natamicina dissolvida com o referido composto; e

(3) opcionalmente, isolar o complexo de natamicina aderido ao composto adequado a partir da fracção líquida, utilizando os métodos conhecidos *per se*. Este composto pode estar presente numa solução aquosa ou suspensão.

O complexo de natamicina aderida a um composto adequado pode ser utilizado para aplicações diferentes incluindo a prevenção de infecções e crescimento de fungos em produtos naturais, sendo estes produtos alimentares ou agrícolas.

Antes da aplicação o complexo formado e opcionalmente purificado pode também ser misturado com sistemas aquosos, tais como água ou composições de revestimento de queijo, ou com outros compostos adequados.

Em vez de isolar o complexo é também possível utilizar o complexo na composição aquosa ou no sistema solvente directamente, por exemplo, na aplicação da composição revestimento de queijo.

Pensa-se que a actividade aumentada de uma composição da presente invenção seja devida à disponibilidade melhorada do composto anti-fúngico como um resultado da dissolução melhorada.

Normalmente, apenas a natamicina que se encontra em solução estará disponível para exercer actividade anti-fúngica. No caso de um fungicida com uma baixa solubilidade, um dos factores que influencia o efeito fungicida é a dissolução do fungicida. Outros factores importantes são a difusão do fungicida dissolvido para a zona de contaminação e a eliminação do fungicida dissolvido. A natamicina, por exemplo, pode ser inactivada por decomposição por acção de luz ou por hidrólise (Daamen, C.B.G. e Berg, G. Van den; "Prevention of mould growth on cheese by means of natamycin" *Voedingsmiddelentechnologie*, 18 (2), 26-29, (1985)).

A natamicina possui uma concentração inibitória mínima (CIM) inferior a 10 ppm para a maioria dos fungos que nascem em produtos alimentares. Tal como acima mencionado, a solubilidade da natamicina em água é de entre 30 a 50 ppm, o que na maioria dos casos é suficiente para prevenir o crescimento de fungos durante um curto período de tempo. A eliminação da natamicina dissolvida é geralmente suficientemente compensada nestas situações por dissolução de natamicina não dissolvida e por difusão da natamicina dissolvida para a zona de infecção.

Na presente invenção é descrito um complexo de natamicina aderido a um composto adequado. São também divulgados métodos para produzir estes complexos.

Um método para produzir o complexo de natamicina aderido a um composto adequado é o de dissolver a natamicina mediante aumento ou redução do pH utilizando métodos conhecidos na técnica. Preferencialmente, o pH é maior do que 10 ou menor do que 4. Exemplos de ácidos aquosos adequados são as

soluções aquosas de HCl, H₂SO₄, ácido cítrico e ácido láctico. Exemplos de soluções alcalinas adequadas são as soluções de hidróxidos, tais como NaOH, KOH e NH₄OH.

A natamicina dissolvida é misturada com o composto adequado, preferencialmente com uma proteína ou com um aminoácido. É utilizada preferencialmente uma proteína de grau alimentar. Os exemplos de proteínas adequadas são as proteínas do leite, e.g., proteína do soro, caseína e caseinatos ou outros compostos, tal como a L-glutamina. Podem também ser utilizadas misturas de proteínas diferentes e misturas de proteínas com outros compostos, tais como gorduras e.g. gorduras vegetais e animais, ou óleos, tais como gordura do leite, manteiga, óleo de soja e óleo de girassol. Podem também ser utilizadas composições ou produtos que contêm estes compostos (misturas de). Exemplos de tais misturas são leite de vaca ou leite de soja.

Após misturar a natamicina dissolvida com o composto adequado, o pH é ajustado para valores entre 5 e 9, preferencialmente entre 6 e 8. Quando o composto adequado não está presente a natamicina cristaliza. Verificou-se surpreendentemente que a presença do composto adequado pode prevenir a formação de cristais visíveis quando se utiliza um microscópio com uma ampliação de 400x. Pensa-se que a natamicina e o composto (e.g. leite, proteínas) formam um complexo, o qual não é visível utilizando um microscópio com esta ampliação. Possivelmente este complexo forma-se à superfície da proteína. Verificámos que a proporções elevadas de natamicina/proteína, parte da natamicina nem sempre forma o complexo, mas, em vez disso, pode formar cristais.

Um outro método para produzir um complexo de natamicina com composto adequado é o de dissolver a natamicina num sistema solvente adequado.

Os sistemas solventes adequados são alcoóis de baixo peso molecular, tais como metanol, etanol, propanol etilenoglicol, propilenoglicol e glicerol e suas misturas. Além disso, num solvente alcoólico adequado, um ou mais grupos hidroxilo podem estar ligados por uma ligação éster a um ácido gordo ou ligados a um outro grupo álcool por uma ligação éter. Os exemplos de tais solventes são metoxietanol e etoxietanol.

Adicionalmente, podem ser adicionados ao solvente agentes solubilizantes, tais como agentes tensioactivos. Exemplos de agentes solubilizantes adequados incluem laurilo sulfato de sódio, sulfosuccinato de dioctilo, cloreto de cálcio ou agentes tensioactivos do tipo não iónico, por exemplo, os que são vendidos sob a marca registada Tween, Span, Brij and Myrj.

A adesão ou a formação de complexo entre a natamicina e a proteína adequada podem ser alcançadas através da adição da proteína à solução ou vice versa. A proteína pode já estar presente num meio aquoso tal como água ou leite.

O complexo de natamicina e uma ou mais proteínas podem ser utilizadas directamente na aplicação desejada ou podem ser posteriormente processadas. Por exemplo, o complexo pode ser isolado e/ou purificado utilizando métodos bem conhecidos. Exemplos de métodos de secagem para separar o complexo a partir de um líquido são a filtração,

centrifugação, evaporação do líquido, secagem por pulverização, secagem por congelamento e secagem em leito fluído.

Além disso, sob condições aquosas, e.g., numa composição para revestimento de queijo, o complexo pode ser armazenado durante um período de tempo longo, e.g., pelo menos meio ano, sem perder actividade substancial.

O complexo purificado de natamicina e uma ou mais proteínas é utilizado para o tratamento de produtos naturais, sendo estes produtos alimentares ou agrícolas.

O complexo não purificado de natamicina e uma ou mais proteínas no sistema aquoso ou no sistema solvente é também utilizado para o tratamento dos referidos produtos naturais.

As composições compreendendo um complexo da invenção podem ser utilizadas para o tratamento de produtos alimentares e agrícolas de acordo com os métodos de tratamento conhecidos per se, e. g., por imersão ou por pulverização.

A composição antifúngica da invenção pode ser utilizada para tratar produtos alimentares ou agrícolas. As composições da invenção particularmente preferidas para utilizar em tratamentos são as emulsões preparadas a partir de emulsões de revestimento normalmente utilizadas na indústria alimentar. Por exemplo, para o tratamento de queijos pode ser utilizada uma emulsão polimérica aquosa do tipo acetato de polivinilo, a qual pode ser aplicada através de escovagem ou com um dispositivo de pulverização. Uma composição da invenção pode também estar sob a forma de

emulsão (e.g. para revestimento) do tipo óleo em água ou água em óleo. Exemplos de preparações adequadas para o tratamento de produtos agrícolas, tais como frutos, são películas de materiais poliméricos, tais como, por exemplo, poliolefinas, e.g. polietileno e polipropileno.

A quantidade de natamicina numa composição líquida para um tratamento de imersão ou pulverização pode estar compreendida entre 0,01% a 2% p/v. Preferencialmente, a quantidade é de 0,01% a 1% p/v. Em princípio o líquido de imersão pode ser de uma qualquer espécie. Quando é utilizado um sistema aquoso, a adição de agente tensioactivo pode ser vantajosa, particularmente no tratamento de objectos com uma superfície hidrofóbica. Agentes tensioactivos úteis são, por exemplo agentes tensioactivos aniónicos, tais como laurilo sulfato de sódio ou éteres polietileno alquilo, tal como Cetomacrogol[®] 1000 ou éteres polioxietileno e.g. Tween[®] 60, 61 e 65.

Numa emulsão de revestimento de acordo com a invenção, a quantidade de natamicina pode ser de 0,005% a 2% p/v, preferencialmente de 0,01% a 1% em p/v e mais preferencialmente entre 0,01% a 0,5% p/v.

Legenda das Figuras

- * Figura 1 mostra a zona de inibição (em mm) de *Penicillium discolour* em função de tempo (dias)
- * Figura 2 mostra a quantidade média de colónias/peça em função de tempo

A invenção será agora descrita para exemplificação com referência aos Exemplos que a acompanham.

EXEMPLO 1

Este exemplo descreve um método microbiológico para determinar a disponibilidade de um componente antifúngico de uma composição antifúngica.

Discos de papel de filtro (S&S Antibiotics Test Discs n° 321260) com um diâmetro de 0,6 cm foram carregados com uma preparação a ser testada. Cada disco foi carregado com 250 µg de natamicina, *i.e.* foram aplicados a um disco 50 µl de uma amostra contendo 5 000 ppm de natamicina. Os discos foram então colocados em agar inoculado com *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9 763 e incubados a 30 °C durante 24 horas. Como referência, foram frescamente carregados discos com um intervalo de quantidades conhecidas de natamicina dissolvida em metanol aquoso.

No dia seguinte, os discos amostra foram transferidos para novas placas de Petri contendo agar inoculado com *Saccharomyces cerevisiae*. Foram preparados novos discos carregados com um intervalo de quantidades conhecidas de natamicina dissolvida para utilizar como referência. As novas placas com discos amostra e as novas referências foram incubadas a 30 °C durante 24 horas.

O tamanho da zona de inibição é uma medida da natamicina libertada a partir do disco amostra. A quantidade de natamicina libertada pode então ser calculada segundo métodos conhecidos.

Ao repetir os procedimentos, a natamicina libertada pode ser medida numa base diária.

EXEMPLO 2

Este exemplo descreve a preparação de complexos de natamicina.

1. Foram dissolvidos 0,5 grama de natamicina em 80 ml de água aumentando o pH para 11,5 utilizando NaOH (4N).
2. Os compostos adequados utilizados para complexar a natamicina foram:
 - Caseinato de sódio (MIPRODAN[®] 30, MD alimentar) 3,3% (p/p) dissolvido em água desmineralizada (A)
 - proteína de soro (ESPIRON[®] 580, DMV Veghel) 6,6% (p/p) dissolvido em água desmineralizada (B)
 - manteiga (Corman)
 - óleo de soja (Cargill)
 - óleo de girassol (Cargill)
 - leite de soja (Provamel) (C)
 - leite esterilizado (Campina) (D)

Foram também preparadas emulsões (500 ml) através da mistura dos seguintes compostos (complexantes) e incubadas durante 5 minutos num equipamento Ultra turax T50 (Janke & Kunkel) a 8.000 - 9.500 rotações por minuto:

- água desmineralizada 96%, manteiga (Corman) 4% (E)
- água desmineralizada 92,7% (p/p), caseinato de sódio 3,3% (p/p), manteiga (Corman) 4,0% (p/p) (F)
- água desmineralizada 92,7%, caseinato de sódio 3,3%, óleo de soja 4% (G)

- água desmineralizada 89,4%, proteína de soro 6,6%,
manteiga 4,0% (H)
 - água desmineralizada 89,4%, proteína de soro 6,6%,
óleo de girassol 4,0% (I)
3. Foram adicionados 5,0 ml de caseinato de sódio dissolvido, proteína de soro dissolvida, leite de soja, leite esterilizado ou das emulsões preparadas (A-I) a alíquotas de 80 ml de natamicina dissolvida.

Como controlo foi preparada uma amostra só com natamicina. (J)

4. O pH de cada uma das amostras foi reduzido para 5,8 por adição de HCl (4N). Foi adicionada água desmineralizada para obter um volume total de 100 ml por amostra.

EXEMPLO 3

Este exemplo descreve a libertação de diferentes formulações de natamicina numa base diária.

50 µl de cada uma das amostras preparadas como descrito no Exemplo 2 (Amostras A a J) foram aplicadas a um disco, como descrito no Exemplo 1.

A libertação de natamicina a partir dos discos foi determinada para 3 dias de acordo com o método descrito no Exemplo 1.

Os resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 : Libertação de natamicina ($\mu\text{g}/\text{disco}$) por dia

Compostos Adequados	Dia		
	1	2	3
J (controlo)	2,5	1,8	1,7
A	8,4	7,6	6,7
B	7,8	5,4	5,3
C	4,2	2,3	2,2
D	6,0	7,4	6,0
E	2,7	2,0	2,1
F	11,3	11,6	5,5
G	9,3	7,7	5,8
H	7,5	6,0	4,0
I	7,8	6,0	4,1

A taxa de libertação da maioria dos complexos de natamicina foi consideravelmente mais elevada do que a taxa de libertação do controlo. Este facto indica que mais natamicina esteve provavelmente disponível para inibir os bolores. Tal como anteriormente descrito, apenas a natamicina dissolvida possui actividade antifúngica. Apenas no caso da formulação E (manteiga), a taxa de libertação de natamicina não é melhorada. No caso da formulação C (leite de soja) apenas foi observada uma maior taxa de libertação no primeiro dia.

EXEMPLO 4

Este exemplo descreve a actividade dos complexos de natamicina contra o *Penicillium discolor*, um fungo mais resistente que por vezes causa problemas de deterioração na indústria de queijos.

Foi preparada uma suspensão de esporos por esfregaço de esporos a partir de uma cultura esporulada de *Penicillium discolour* e por suspensão dos esporos em água esterilizada com Tween 0,05 %.

A suspensão de esporos acabada de preparar foi misturada com agar para fungos para obter uma concentração final de 10^2 esporos/ml de agar, e as placas de agar foram preparadas. No meio da placa foi feito um orifício com 5mm de diâmetro.

Dentro do orifício foram injectados 25 µl das formulações A, B, C, D, F, I e J (do Exemplo 2).

As placas foram incubadas durante 6 dias a 24 °C. Após 2, 3 e 6 dias, as zonas de inibição foram medidas. Os resultados são apresentados na Figura 1.

A Figura 1 demonstra claramente que o *P. discolour* foi inibido numa extensão maior pelas novas concentrações do que com natamicina isoladamente.

EXEMPLO 5

Este exemplo ilustra o efeito dos complexos de natamicina contra a espécie *Penicillium discolour* no queijo.

As composições A, B, D, F e J foram preparadas como descrito no Exemplo 2.

5 ml de cada composição foram misturados com 45 ml de Plasticoat® (uma emulsão aquosa de acetato de polivinilo

fornecida por National Starch and Chemicals B. V.) de tal forma que as emulsões de revestimento foram obtidas contendo 500 ppm de natamicina.

Foi também preparada uma emulsão de revestimento sem natamicina para servir de controlo (K).

As composições de revestimento foram aplicadas à superfície de queijo Gouda de acordo com o seguinte procedimento:

Um queijo Gouda acabado de retirar da salmoura foi primeiro cortado horizontalmente em duas partes. Cada parte foi então cortada em pedaços de 5 por 5 por 5 cm. Foram utilizados na experiência apenas os pedaços com uma superfície plana de casca. Estes pedaços foram mergulhados num banho de parafina fundida a 80 °C, de forma a que a superfície de casca permanecesse sem parafina, enquanto as restantes cinco superfícies foram revestidas por uma película fina de parafina.

A superfície de casca foi então inoculada com cerca de $1,9 \times 10^3$ CFU/cm² de uma mistura de esporos de três espécies de *Penicillium discolor* (números CBS: 611.92, 612.92 e 613.92). A inoculação foi levada a cabo mediante a aplicação, na superfície do cubo de queijo, de 0,15 ml de uma suspensão de esporos contendo cerca de 2×10^5 CFU/ml. O inóculo foi espalhado uniformemente pela superfície com uma escova estéril, estando saturado com uma suspensão de esporos.

Após permanecerem durante a noite em caixas plásticas fechadas a cerca de 6 °C, os cubos de queijo foram tratados com composições diferentes. Para cada tratamento foram

utilizadas 4 cubos de queijo. A cada cubo de queijo foram aplicados 0,8 ml da composição A, B, D, F, J ou K e espalhados uniformemente pela superfície com uma peça de plástico estéril rectangular de cerca de 2 por 5 cm. Após repouso durante 2 horas a condições ambientes, os cubos de queijo foram incubados a 15 °C e a uma humidade relativa de 95%.

Todos os dias o número de colónias visíveis formadas em cada cubo de queijo foi determinado e o número médio por cubo foi calculado para cada tratamento. Quando o número de colónias para um cubo de queijo excedeu o valor de 50, o cubo de queijo foi considerado como estando completamente coberto com o fungo.

Os resultados são apresentados na Figura 2.

Os resultados demonstram claramente a superioridade das composições de acordo com a invenção sobre a natamicina isoladamente. A Figura 2 demonstra que as novas composições reduzem consideravelmente a quantidade de colónias nos cubos de queijo. Mesmo após 3 semanas não foi observado crescimento de qualquer fungo, enquanto que os cubos controlo tratados com natamicina (J) preveniram o crescimento de fungos apenas durante 15 dias.

EXEMPLO 6

Este exemplo ilustra o efeito da concentração de caseinato de sódio versus a libertação de natamicina.

Foi preparada uma solução de caseinato de sódio 15% por dissolução de 15 gramas de caseinato de sódio em 100 ml de água.

Os complexos de natamicina preparados foram como abaixo descrito:

1. 0,5 gramas de natamicina foram dissolvidas em 75 ml de água por aumento de pH para 11,5 utilizando NaOH (4N).
2. 25 (L), 20 (M), 15 (N), 10 (O), 5 (P), 1 (Q), 0,5 (R), ou 0,1 (S) ml de caseinato de sódio (15%) foram adicionados à água.
3. O pH de cada uma das amostras foi reduzido para 5,8 por adição de HCl (4N). A água foi adicionada para um volume total de 100 ml por amostra.

Como controlo foi preparada uma amostra (J) apenas com natamicina.

50 µl de cada amostra (formulações J e L a S) foram aplicados a um disco como descrito no Exemplo 1.

A libertação de natamicina a partir dos discos foi determinada para 3 dias segundo o método descrito no Exemplo 1.

Verificou-se que a natamicina libertada da amostra controlo (J) foi de 2 µg por dia

Verificou-se que a natamicina libertada das composições L, M, N, O, P e Q foi de 3,5 (Q) a mais do que 8 (L) vezes maior no dia 1.

Nos dias 2 e 3 a libertação destas composições foi 2 a 4 vezes maior do que a do controlo (J).

A libertação para as composições R e S foi maior no dia 1 (5 µg de natamicina). Nos dias 2 e 3 a libertação de natamicina foi comparável à do controlo (J).

EXEMPLO 7

Este exemplo descreve a libertação de natamicina a partir do complexo de caseinato de sódio "N" (ver Exemplo 6) em acetato de polivinilo (PVA) utilizando o teste de dissolução.

A composição "N" foi preparada como descrito no exemplo 6. A referida composição foi misturada com Plasticoat®, uma emulsão aquosa de PVA fornecida pelo National Starch & Chemical B. V., como se segue:

- * 5 ml da composição "N" foram misturados com 45 g de PVA (composição "N-PVA")
- * cada disco (ver Exemplo 1) foi carregado com 50 µl da composição "N-PVA" (contendo 25 µg de natamicina)
- * os discos foram secos por incubação durante 24 horas a temperatura ambiente
- * os discos foram colocados em placas de agar (ver Exemplo 1) e incubados durante 24 horas a 6 °C
- * os discos foram retirados das placas de agar e colocados numa outra placa de agar, após o que as placas pré-incubadas foram incubadas durante 24 horas a 30 °C.
- * a quantidade de natamicina libertada foi calculada como descrito no Exemplo 1.

Como controlo foi preparada uma amostra ("PVA-J") apenas com natamicina.

A libertação de natamicina a partir dos discos foi determinada durante 3 dias. Os resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 : Libertação de natamicina em PVA ($\mu\text{g}/\text{disco}$)
por dia

Composição	Dia		
	1	2	3
PVA-J	1,5	2,5	2,5
PVA-N	4,0	4,5	3,0

A taxa de libertação da composição PVA-N é consideravelmente maior do que a taxa de libertação da composição controlo; o que significa que se a composição N for adicionada à composição de revestimento PVA, mais natamicina estará também disponível para inibir os fungos.

EXEMPLO 8

Este exemplo descreve o isolamento e a estabilidade das novas composições de natamicina.

A composição N foi preparada como descrito no exemplo 6. Foi então produzido um pó como se segue:

- * foram preparados 2,1 l da composição N
- * a amostra foi seca utilizando um secador de pulverização (Buchi), utilizando métodos conhecidos, originando 71 g de pó (POW-N)
- * a composição pó foi armazenada a 6 °C em recipientes fechados.

A quantidade de natamicina após secagem por pulverização (14,5%) (p/p) foi praticamente a mesma que a quantidade máxima de natamicina que seria de esperar (15,3%) (p/p) com base na quantidade de natamicina adicionada antes da secagem por pulverização.

A composição nova não é inativada pelo processo de secagem por pulverização.

A estabilidade da composição em pó foi determinada através de medição do teor em natamicina do pó por CLAP (HPLC, de acordo com IDF standard 140, International Dairy Federation, 1987) imediatamente após a preparação e 28 dias depois de armazenamento a 20 °C na ausência de luz.

Não ocorreu alteração significativa na concentração de natamicina após 28 dias de armazenamento. Imediatamente após a produção e depois de 28 dias de armazenamento a concentração de natamicina era de 14,5% (p/p).

A composição em pó "POW-N" foi dissolvida em água e adicionada à composição PVA para obter uma concentração final de 250 ppm. A estabilidade da natamicina nesta nova formulação (POW-PVA-N) foi determinada por medição do teor em natamicina imediatamente após a preparação e depois de 28 dias de armazenamento a 15 °C sob ausência de luz. Em ambos os casos a concentração de natamicina foi de 250 ppm.

A libertação de natamicina a partir da formulação "POW-N" imediatamente após a preparação e após 4 semanas de armazenamento a 6 °C foi determinada como se segue:

- * "POW-N" foi dissolvida em água para obter uma concentração final de 5.000 ppm
- * cada disco (ver Exemplo 1) foi carregado com 50 µl da formulação dissolvida (contendo 250 µg de natamicina)
- * os discos foram colocados em placas de agar (Ver Exemplo 1) e incubados durante 24 horas a 6 °C.
- * os discos foram retirados das placas de agar e colocados numa outra placa de agar, após o que as placas pré-incubadas foram incubadas durante 24 horas a 30 °C.
- * a quantidade de natamicina libertada foi calculada como descrito no Exemplo 1.

Os resultados são apresentados na Tabela 3.

A libertação de natamicina a partir da formulação "POW-PVA-N" imediatamente após a preparação e após 4 semanas de armazenamento a 15 °C foi determinada como se segue:

- * a composição em pó "POW-N" foi dissolvida em água e adicionada a PVA para obter uma concentração final de 5.000 ppm (POW-PVA-N)
- * cada disco (ver Exemplo 1) foi carregado com 50 µl da composição "POW-PVA-N" (contendo 25 µg de natamicina)
- * os discos foram secos por incubação durante 24 horas à temperatura ambiente
- * os discos foram colocados em placas de agar (Ver Exemplo 1) e incubados durante 24 horas a 6 °C.
- * os discos foram retirados das placas de agar e colocados numa outra placa de agar, após o que as placas pré-incubadas foram incubadas durante 24 horas a 30 °C.

* a quantidade de natamicina libertada foi calculada como descrito no Exemplo 1.

Os resultados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Libertação de natamicina ($\mu\text{g}/\text{disco}$) imediatamente após preparação e após 4 semanas de armazenamento

Composição	Após preparação	28 dias
POW-N	43,0	43,0
PVA-POW-N	3,5	3,5

Nota: a libertação a partir de uma formulação PVA é sempre inferior, devido às propriedades de retardamento da matriz PVA.

Estes resultados demonstram claramente que as novas formulações, quando produzidas sob a formulação de pó ou quando formuladas em PVA, são estáveis e mantêm a sua actividade melhorada.

EXEMPLO 9

Este exemplo ilustra o efeito das novas composições de natamicina sobre os fungos no queijo Edam. A experiência foi realizada numa fábrica de queijos na qual se produzia queijo Edam. Na altura da realização do ensaio em campo existiam problemas de fungos causados por *Penicillium discolor*. Esta fábrica de queijo foi escolhida para demonstrar a actividade aumentada sobre as espécies de fungos menos sensíveis na prática.

As composições de revestimento foram preparadas como se segue:

- 1 A composição revestimento A foi preparada como a "POW-PVA-N" (ver exemplo 8), a única diferença com a "POW-PVA-N" foi que a composição revestimento A contém 500 ppm de natamicina.
- 2 A composição revestimento B foi uma composição padrão Plasticoat® contendo 500 ppm de natamicina padrão.

96 queijos Edam de 2,5 Kg foram produzidos utilizando métodos bem conhecidos. 48 queijos foram tratados com uma composição revestimento A, 48 queijos foram revestidos com a composição de revestimento B, utilizando métodos bem conhecidos. Os queijos foram revestidos duas vezes (aproximadamente 7 gramas de revestimento por queijo por tratamento). Após salmoura, os queijos foram armazenados durante 3 dias, após o que os queijos secos foram tratados com a composição revestimento pela primeira vez. Após 5 dias os queijos foram virados. O segundo tratamento foi após 8 dias. Após 11 dias os queijos foram virados. Os queijos estavam armazenados para maturação sob condições padrão (humidade relativa de 87%, temperatura de 11 °C).

21 dias depois da produção os queijos foram examinados visualmente em relação ao crescimento de fungos na superfície. Nos 22 queijos tratados com a composição revestimento padrão (composição de revestimento B) foram observadas colónias de fungos. Nos queijos tratados com a nova formulação (composição de revestimento A) apenas foram observadas colónias de fungos em 3 queijos.

Estes resultados demonstram que a nova composição é também mais eficaz no combate aos fungos no queijo Edam produzido e armazenado numa fábrica de queijo.

Lisboa, 27 de Junho de 2007

REIVINDICAÇÕES

1. Complexo compreendendo natamicina complexada com uma ou mais proteínas ou aminoácidos, o qual, quando presente em água, não produz cristais visíveis, utilizando um microscópio que possui uma amplificação de 400x.
2. Complexo de acordo com a reivindicação 1, o qual, quando presente em água, não perde substancialmente a actividade durante 60 dias.
3. Complexo de acordo com a reivindicação 1, em que a proporção de natamicina para a quantidade total de proteína ou de aminoácido é de 10.000:1 a 1:10.
4. Complexo de acordo com a reivindicação 3, em que a proporção de natamicina para a quantidade total de proteína ou de aminoácido é de 100:1 a 1:1.
5. Complexo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, em que pelo menos uma das proteínas é uma proteína de leite.
6. Complexo de acordo com a reivindicação 5, em que a proteína de leite compreende uma proteína de soro, caseína ou caseinato.
7. Composição compreendendo um complexo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores e uma gordura ou óleo.

8. Composição de acordo com a reivindicação 7, em que pelo menos uma das proteínas presentes no complexo e a gordura ou óleo são ambos originários de leite.
9. Composição de acordo com a reivindicação 8, em que o leite é leite de vaca ou leite de soja.
10. Processo para a preparação de um complexo como o definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, compreendendo:
 - dissolver natamicina num solvente,
 - misturar a natamicina dissolvida com uma ou mais proteínas,
 - isolar opcionalmente o complexo formado.
11. Processo de acordo com a reivindicação 10, em que o solvente é um líquido aquoso e a dissolução da natamicina é alcançada por redução ou aumento do pH.
12. Processo de acordo com a reivindicação 11, em que o complexo é formado por ajuste do pH da mistura de natamicina dissolvida e proteína para valores compreendidos entre 5 e 9.
13. Processo de acordo com a reivindicação 10, em que o solvente é um solvente orgânico, e o complexo forma-se neste solvente ou num líquido compreendendo este solvente.
14. Uso de um complexo como o reivindicado em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, ou de uma composição como a reivindicada em qualquer uma das reivindicações 7 a 9, como um tratamento antimicótico

preventivo para produtos naturais, os quais são produtos agrícolas ou alimentares.

15. Produto natural, sendo este um produto agrícola ou alimentar, o qual foi tratado com um complexo como o reivindicado nas reivindicações 1 a 6 ou composição como a reivindicada nas reivindicações 7 a 9.

Lisboa, 27 de Junho de 2007

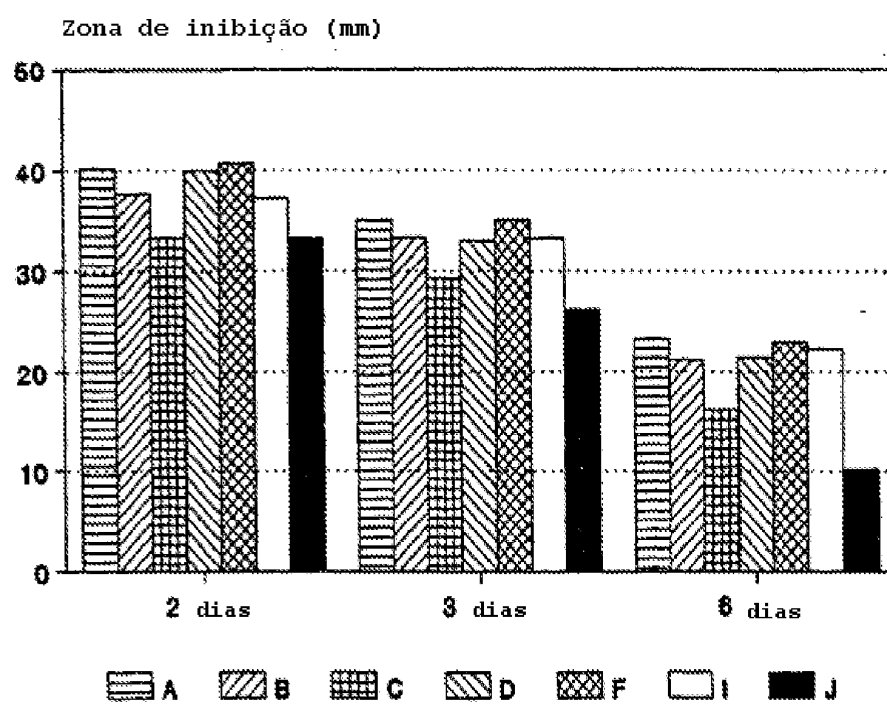


FIG. 1

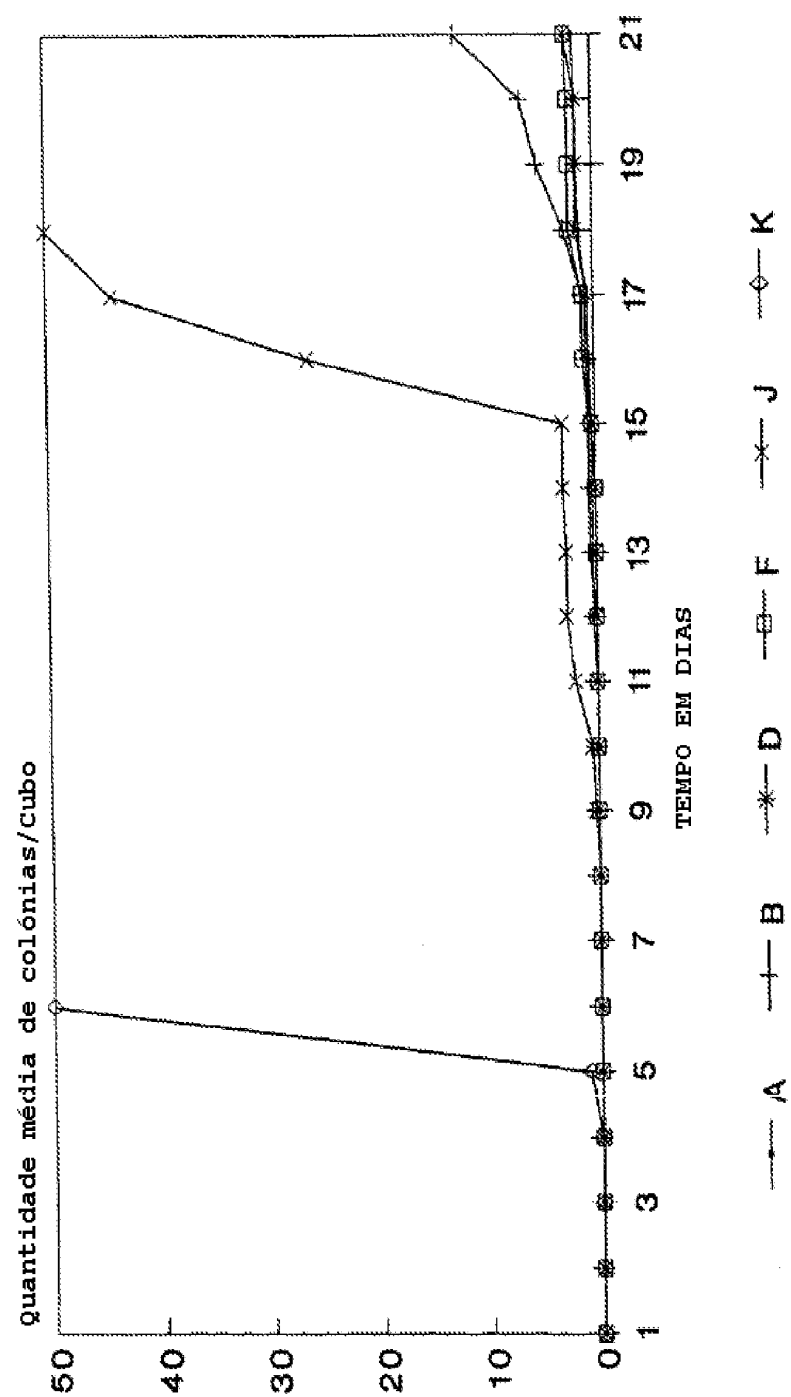


FIG. 2