



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0613802-0 A2**

(22) Data de Depósito: 27/06/2006
(43) Data da Publicação: 15/02/2011
(RPI 2093)



(51) Int.Cl.:

A23L 1/30
A23L 1/03
A23C 9/12
A23D 7/005
A23G 9/00
A23L 2/52
A21D 13/00
A23L 1/28

(54) Título: **MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE UM
PRODUTO COMESTÍVEL E PRODUTO COMESTÍVEL**

(30) Prioridade Unionista: 20/07/2005 EP 05076667.4

(73) Titular(es): Unilever N.V.

(72) Inventor(es): Adrianus Marinus Ledebøer, Ruud Albers,
Stanley Brul

(74) Procurador(es): Cristiane Araújo Rodrigues

(86) Pedido Internacional: PCT EP2006006233 de 27/06/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/031129 de 22/03/2007

(57) Resumo: MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE UM PRODUTO COMESTÍVEL E PRODUTO COMESTÍVEL A presente invenção refere-se a um método para a preparação de um produto comestível que compreende bolores e/ou leveduras não viáveis que são substancialmente intactas na estrutura e que fornecem um benefício à saúde, o método compreende submeter os bolores e/ou leveduras viáveis a pelo menos dois tratamentos sub-letais para obter os bolores e/ou leveduras não viáveis fornecendo um benefício à saúde, cada tratamento sub-letal independentemente não sendo suficiente para gerar os bolores e/ou leveduras não viáveis.

“MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE UM PRODUTO COMESTÍVEL E PRODUTO COMESTÍVEL”

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a produtos comestíveis, em especial, a produtos comestíveis e bebidas que compreendem os bolores e/ou leveduras que não são viáveis, mas que ainda são substancialmente intactas na estrutura e que quando administradas em quantidades apropriadas, fornecem um efeito benéfico, em particular, um benefício à saúde, para o indivíduo que as consome. Em particular, a presente invenção refere-se a ditos produtos comestíveis que compreendem tais bolores e/ou leveduras, que foram submetidos a dois ou mais tratamentos sub-letais.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

A aplicação de microorganismos nos produtos alimentícios tem sido associada aos efeitos na saúde, vide, por exemplo, (P. Prtiti e F. Tonelli, J. of *Chemotherapy* 113 (2001) 473-493). Em particular, a aplicação de bactéria probiótica é associada aos efeitos na saúde, por exemplo, com relação ao bem-estar intestinal, tal como IBS (Síndrome do Intestino Irritável), redução da má digestão da lactose, sintomas clínicos de diarreia, estimulação imune, atividade antitumoral e intensificação da ingestão mineral (A. C. Ouwehand et al., em *Int. Dairy Journal* 8 (1998) 749-758). Da mesma maneira, a aplicação da levedura probiótica *Saccharomyces boulardii* é associada ao tratamento e prevenção de diarreia aguda (Kurugol, *Acta Paediatrica*. 2005 94 (1) 44-7) e persistente (Gaon, *Medicina* 2003; 63 (4) 293-8) em crianças, amebíase induzida por antibióticos (Mansour – Ghanaei; *World J Gastroenterology* 2003 9 (8) 1832-3), e infecções por *Clostridium difficile* (Surawicz, *Gastroenterology* 1998, 96 981-988) e tratamento de manutenção da doença de Crohn (Guslárdi Dig. Dis Sci 2000, 45 1462-4).

Em geral, acredita-se que alguns dos efeitos na saúde de

microorganismos probióticos estão relacionados às suas propriedades imunomodulatórias e antiinflamatórias nos locais de mucosa. Estes efeitos na saúde são mais provavelmente iniciados pelos seus efeitos no sistema imune das mucosas no íleo e no jejuno. Demonstrou-se que ditos efeitos modulatórios de microorganismos afetam de maneira benéfica, por exemplo, a resistência às infecções, doenças alérgicas e doenças inflamatórias intestinais.

É geralmente reconhecido no estado da técnica que a inclusão de certos bolores e/ou leveduras em produtos comestíveis, tais como produtos alimentícios, é desejável para fornecer benefícios à saúde no consumo do produto comestível.

Tradicionalmente, os microorganismos probióticos têm sido empregados como microorganismos viáveis, à medida que se acreditava que eles deviam estar no estado viável para que fornecessem seus efeitos benéficos à saúde.

Entretanto, utilizar apenas bolores e/ou leveduras viáveis possui a desvantagem de seu uso ser limitado aos produtos comestíveis possuindo características do produto que são apropriados para os bolores e/ou leveduras viáveis e que são produzidos pelas técnicas de processamento que são apropriadas para tal. Isto significa que tais produtos comestíveis são caros para preparar e que os métodos de armazenamento de bolores e/ou leveduras viáveis e os alimentos que as compreendem são complicados, e, portanto, aumentam ainda os custos dos produtos comestíveis.

Além disso, um problema com o uso de bolores e/ou leveduras viáveis nos produtos alimentícios está no fato da formulação do produto precisar ser freqüentemente adaptada para assegurar que o caráter viável dos bolores e/ou leveduras possa ser mantido. Por exemplo, os baixos ou altos valores de pH para o produto comestível podem não ser apropriados, os altos teores de mineral podem não ser possíveis e/ou o produto pode precisar de

uma atividade de água mínima. Isto limita a flexibilidade de formulação dos produtos comestíveis, o que é indesejável.

Outro possível problema com o uso de bolores e/ou leveduras viáveis nos produtos comestíveis é que freqüentemente os produtos irão
5 requerer armazenamento em temperaturas relativamente baixas para assegurar que eles não sejam fermentados ou deteriorados pelos bolores e/ou leveduras. Se o processo de fermentação ocorrer, isto pode acarretar em produtos que possuem propriedades organolépticas indesejáveis, tais como estrutura física fraca e/ou aroma ruim. Se ocorrer o processo de deterioração,
10 isto irá gerar produtos inadequados para o consumo.

Foi sugerido que a bactéria probiótica não precisa estar em um estado viável a fim de conferir pelo menos alguns dos seus efeitos probióticos a um indivíduo que a consome. Por exemplo, A. C. Ouwehand et al., em Int. Dairy Journal 8 (1998) 749-758 discute os efeitos à saúde de produtos lácteos
15 tratados com bactéria viável e não-viável.

O documento WO 2004/069156 descreve as formulações que compreendem bactérias probióticas inativadas. As bactérias são inativadas por tratamentos por irradiação. O estudo pelos mesmos inventores "*Tool-like receptors 9 signalling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in
20 murine experimental colitis*", por Rachmilewitz et al., *Gastroenterology* 2004, 126: 520 – 528 descreve o que os inventores acreditam ser a teoria por detrás da inativação e do efeito probiótico remanescente.

As referências de Rachmilewitz indicam que algumas das propriedades imunomodulatórias e antiinflamatórias importantes dos
25 microorganismos probióticos viáveis podem ser retidas em microorganismos não viáveis se eles se tornarem não viáveis em certas condições. Estas referências sugerem que quando microorganismos que se tornam não viáveis em vias convencionais, tais como pasteurização ou esterilização, sua

integridade estrutural é danificada, o que resulta na rápida desintegração dos microorganismos não viáveis nas partes proximais do trato intestinal. Em contraste, os microorganismos não viáveis de Rachmilewitz que se tornam não viáveis pelo uso da radiação gama são relatados por reterem sua integridade

5 no trato intestinal proximal, o que permite a interação de padrões microbianos particulares, neste caso o DNA não metilado, com receptores do tipo Toll no sistema imune das mucosas. Tais interações são então descritas como resultando nos efeitos imunomodulatórios e antiinflamatórios descritos.

O documento WO 01/95741 descreve o uso de bactéria

10 *Lactobacillus* não viáveis em produtos alimentícios. As bactérias *Lactobacillus* se tornam não viáveis pela aplicação de uma única etapa de processamento e ao prevenir que o produto alimentício sofra fermentação adicional na presença da bactéria.

Enquanto é sugerido no estado da técnica que certas bactérias

15 não viáveis possam fornecer pelo menos alguns benefícios à saúde úteis, até agora não houve nenhuma insinuação no estado da técnica que os bolores e/ou leveduras que se tornaram não viáveis ainda sejam capazes de fornecer benefícios à saúde ao indivíduo que os consome.

O uso de tal etapa de processamento única para gerar

20 microorganismos tais como bolores e/ou leveduras não viáveis pode possuir uma ou mais das seguintes desvantagens:

- a única etapa do processamento pode ser difícil de controlar, tal que não é sempre possível assegurar que a população se torne não viável enquanto mantém a integridade estrutural de bolores e/ou leveduras,
- 25 - diferentes condições de processamento podem ser aplicadas através do todo de um produto alimentício ou através de uma batelada de tais produtos, tal que o tratamento é ineficaz ou irregular,
- as condições de processamento adversas de uma única etapa

podem ser prejudiciais ao produto alimentício em si,

- as condições utilizadas podem limitar a flexibilidade da formulação alimentícia ou as condições de processamento na medida em que a etapa de processamento única precisa atingir condições que são adversas o suficiente para gerar bolores e/ou leveduras não viáveis,

- onde a irradiação é utilizada como a única etapa de processamento, isto em geral possui baixa aceitabilidade pelo consumidor ou ela pode não ser amplamente permitida ou aceita em diferentes regiões.

A presente invenção procura endereçar um ou mais dos problemas acima.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

Em particular, a presente invenção procura fornecer um método conveniente e eficaz de fornecer um produto comestível que compreende bolores e/ou leveduras não viáveis que fornecem benefícios à saúde. Em particular, a presente invenção procura fornecer um método que possa ser utilizado para preparar uma ampla variedade de produtos comestíveis que compreendem os tipos de bolores e/ou leveduras mencionados acima.

De modo surpreendente, foi revelado que quando bolores e/ou leveduras se tornam não viáveis de uma maneira em que eles permaneçam substancialmente intactos na estrutura quando não viáveis, eles ainda são capazes de fornecer benefícios à saúde ao indivíduo que os consome. Foi ainda revelado que quando pelo menos dois tratamentos são utilizados em bolores e/ou leveduras para gerar não viáveis, cada tratamento independentemente não sendo suficientes para gerar bactérias não viáveis em uma única etapa, os bolores e/ou leveduras que se tornam não viáveis fornecem benefícios especialmente bons.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Assim, de acordo com um primeiro aspecto, a presente invenção

fornece um método para a preparação de um produto comestível que compreende bolores e/ou leveduras não viáveis, cujos bolores e/ou leveduras são substancialmente intactos na estrutura e que fornecem um benefício à saúde ao indivíduo que consome os bolores e/ou leveduras, em que o método
5 compreende submeter os bolores e/ou leveduras viáveis a pelo menos dois tratamentos sub-letais para obter os bolores e/ou leveduras não viáveis fornecendo um benefício à saúde, cada tratamento sub-letal independentemente não sendo suficiente para gerar os bolores e/ou leveduras não viáveis.

10 É preferível que estes tratamentos sub-letais sejam selecionados independentemente a partir de:

- (i) aplicação de pressão,
- (ii) ajuste de pH,
- (iii) ajuste da pressão osmótica,
- 15 (iv) aquecimento,
- (v) homogeneização,
- (vi) ciclos de congelamento – descongelamento,
- (vii) secagem por aspersão,
- (viii) adição de um ou mais agentes que possuem um efeito
20 fungicida,
- (ix) aplicação de um campo elétrico pulsado.

É preferível que o produto comestível seja um produto alimentício ou uma bebida. É preferível que o benefício à saúde seja um efeito probiótico.

É ainda preferível que os bolores e/ou leveduras que fornecem dito
25 benefício à saúde sejam bolores e/ou leveduras não patogênicos. É ainda preferível que os bolores e/ou leveduras retenham padrões microbianos conservados que possam ser reconhecidos pelos receptores de reconhecimento padrão do sistema imune, de preferência, que os padrões microbianos conservados compreendam

DNA e/ou constituintes da parede celular.

É ainda preferido que os bolores sejam selecionados a partir do gênero *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor* e *Penicillium* e, em especial, as espécies *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *Mucor miehei*.

5 Ainda, é preferível que as leveduras sejam selecionadas a partir do gênero *Saccharomyces*, *Debaromyces*, *Kluyveromyces* e *Pichia* e, em especial, as espécies *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii*.

10 De preferência, o produto comestível contém entre 10^6 e 10^{11} bolores e/ou leveduras por porção.

A presente invenção fornece diversas vantagens incluindo que os bolores e/ou leveduras se tornam não viáveis, mas permanecem substancialmente intactos na estrutura e retêm suas capacidades de modular a função imune e as respostas inflamatórias. Isto maximiza a retenção dos
15 benefícios à saúde de bolores e/ou leveduras. O uso de bolores e/ou leveduras substancialmente intactos na estrutura não viáveis apresenta diversas vantagens incluindo que:

- isto elimina o risco de translocação/ infecção a partir de leveduras ou bolores em indivíduos suscetíveis ou imuno-comprometidos,
- 20 - os bolores e/ou leveduras não viáveis podem ser facilmente incorporados em produtos comestíveis à medida que eles não requerem necessariamente condições especiais de processamento, manipulação ou armazenamento.

Além disso, uma ou mais das seguintes vantagens também
25 podem ser obtidas de acordo com a presente invenção quando o tratamento compreende pelo menos dois tratamentos sub-letais:

- os dois tratamentos sub-letais poderiam ser realizados em tempos diferentes durante a preparação do produto comestível conforme

requerido e/ou por diferentes operadores, por exemplo, um pelo fabricante do produto comestível e outro pelo consumidor do produto,

- o uso de pelo menos dois tratamentos sub-letais fornece flexibilidade na preparação do produto comestível à medida que não é necessário o uso de um único tratamento adverso. Isto leva em conta diferentes etapas a serem selecionadas dependentes do tipo de produto comestível e tais etapas podem ser freqüentemente selecionadas a partir de técnicas de processamento convencionais. Além disso, estas podem fornecer melhores propriedades nutricionais e sensoriais para os produtos comestíveis,

- como diferentes tratamentos subletais podem ser combinados para gerar os bolores e/ou leveduras não viáveis, não é necessário recorrer somente aos tratamentos que possuem, em geral, baixa aceitação do consumidor, tal como a irradiação.

Assim, de acordo com um segundo aspecto, a presente invenção fornece um produto comestível capaz de ser obtido de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção.

De preferência, o produto comestível é um produto alimentício ou uma bebida.

"Bolores e/ou leveduras probióticos", conforme utilizado no presente significa bolores e/ou leveduras que quando administrados em quantidades apropriadas conferem um benefício à saúde de seu consumidor.

Pelo termo "benefício à saúde", conforme utilizado no presente, entende-se melhorar ou manter pelo menos um aspecto da saúde de um indivíduo.

Pelo termo "bolores e/ou leveduras não viáveis", conforme utilizado no presente, entende-se uma população de bolores e/ou leveduras que não é capaz de replicação em qualquer condição conhecida. Entretanto, deve ser entendido que devido às variações biológicas normais em uma

população, uma pequena porcentagem da população (isto é, 5% ou menos) pode ainda ser viável e, assim, capaz de replicação nas condições de crescimentos adequadas em uma população que é definida de outra maneira como não viável. A porcentagem de uma população que é viável pode ser
5 determinada com o auxílio dos métodos de contagem bem conhecidos no estado da técnica. Estes métodos empregam, de preferência, condições de crescimento (meio de crescimento, temperatura, etc) que são ótimos para o crescimento de bolores e/ou leveduras testados.

Pelo termo "bolores e/ou leveduras viáveis", conforme utilizado no
10 presente, entende-se uma população de bolores e/ou leveduras que é capaz de replicação em condições apropriadas sob as quais a replicação é possível. Entretanto, deve ser entendido que devido às variações biológicas normais em uma população, uma pequena porcentagem da população (isto é, 5% ou menos) pode ainda ser não viável e, assim, não capaz de replicação sob aquelas condições em
15 uma população que é definida, de outra maneira, como viável.

Pelo termo "colocar em contato", conforme utilizado no presente, entende-se que os bolores e/ou leveduras e o produto comestível ou pelo menos um de seus ingredientes são colocados em contato direto entre si por quaisquer meios apropriados.

20 Pelo termo "tratamento sub-letal", conforme utilizado no presente, entende-se um tratamento sob o qual uma população de bolores e/ou leveduras é danificada, mas não perdeu completamente sua capacidade de replicação como população, tal que isto é, pelo menos em parte, retida ou pode ser recuperada em condições de crescimento apropriadas para aqueles tipos
25 de bolores e/ou leveduras. A combinação de dois ou mais tratamentos sub-letais de acordo com a presente invenção resulta em pelo menos 95% da população sendo tornada não viável. De preferência, a combinação mencionada acima de tratamentos sub-letais resulta na população de bolores

e/ou leveduras sendo tornadas não viáveis.

Pelo termo “condições de crescimento adequadas”, conforme utilizado no presente, entende-se as condições para uma dada cepa de bolor ou levedura sob as quais a cepa irá replicar e se refere a uma combinação de
5 pH, meio e temperatura onde normalmente uma versão diluída de dita cepa na forma viável (diz-se cerca de 10^6 bolores e/ou leveduras por grama) iria crescer a uma densidade de pelo menos 10^8 bolores e/ou leveduras por grama dentro de um período normal de crescimento.

Pelo termo “bolores e/ou leveduras patogênicos”, conforme
10 utilizado no presente, entende-se bolores e/ou leveduras que são capazes de causar uma infecção em um hospedeiro imunocompetente ou que é capaz de intoxicar tal hospedeiro em condições apropriadas.

Pelo termo “bolores e/ou leveduras não patogênicos”, conforme utilizado no presente, entende-se bolores e/ou leveduras que não são capazes
15 de causar uma infecção em um hospedeiro imunocompetente ou que não são capazes de intoxicar tal hospedeiro em condições apropriadas.

Pelo termo “substancialmente intactos na estrutura”, conforme utilizado no presente, entende-se bolores e/ou leveduras não viáveis que ainda estão suficientemente intactos para evitar ou atrasar a desintegração no trato
20 intestinal distal, permitindo desta forma a interação (estruturas conservadas) de bolores e/ou leveduras não viáveis com o sistema imune, em particular, o sistema imune da mucosa.

Pelo termo “por porção”, conforme utilizado no presente, entende-se a quantidade de um dado produto comestível e, em especial, a um produto
25 alimentício ou uma bebida, que é destinado a ser ou é embalado de modo a ser consumido em uma única ocasião. Portanto, o produto também pode ser embalado como porções múltiplas.

Pelo termo “compreende”, entende-se como não sendo limitante a

quaisquer dos elementos subsequentelemente afirmados, mas de preferência para englobar elementos não especificados de maior ou menor importância funcional. Em outras palavras, as etapas, elementos ou opções listados não precisam ser exaustivos. Toda vez que as palavras “incluindo” ou “possuindo”
5 forem utilizadas, estes termos pretendem ser equivalentes a “compreende” conforme definido acima.

Exceto nos Exemplos operantes e Comparativos, ou onde indicado explicitamente de outra maneira, todos os números neste relatório descritivo que indicam quantidades de material ou condições de reação,
10 propriedades físicas de materiais e/ou uso devem ser entendidos como modificados pela palavra “cerca de”. Todas as quantidades estão em peso, com base no peso total do produto relevante, salvo indicação em contrário.

Salvo indicação em contrário, todas as porcentagens estão em peso, com base no peso total da composição.

15 Para uma explicação mais completa do supracitado e outras características e vantagens da presente invenção, deve ser feita referência à seguinte descrição das realizações preferidas. As realizações preferidas se aplicam a todos os aspectos da presente invenção e podem ser utilizadas conforme apropriado para cada aspecto a menos que o contexto exija o
20 contrário.

Em princípio, qualquer combinação de tratamentos que gere bolores e/ou leveduras não viáveis, mas que os deixem substancialmente intactos na estrutura pode ser utilizado de acordo com a presente invenção.

Os tratamentos particulares que podem ser utilizados, como um
25 processo de etapa única para gerar bolores e/ou leveduras não viáveis, mas substancialmente intactos na estrutura, incluem;

- Aquecimento a uma temperatura de 20° C a 25° C acima da temperatura de crescimento ótima por entre 5 a 10 minutos,

- Irradiação de 1 a 5 Megarad, por exemplo, utilizando uma fonte de ^{137}Cs em uma taxa de 8 Gy/ min durante a noite ou condições similares.

TRATAMENTOS SUB-LETAIS

De acordo com a presente invenção, os bolores e/ou leveduras que fornecem um benefício à saúde ao indivíduo que consome os bolores e/ou leveduras, ou uma mistura de ditos bolores e/ou leveduras e pelo menos um ingrediente de um produto comestível, ou um produto comestível que compreende tais bolores e/ou leveduras são submetidos à pelo menos dois tratamentos sub-letais durante a preparação de um produto comestível, cada tratamento sub-letal independentemente não sendo suficiente para gerar bolores e/ou leveduras não viáveis. Estes tratamentos podem ocorrer antes da incorporação dos bolores e/ou leveduras no produto comestível, por exemplo, ao tratar os bolores e/ou leveduras ou uma mistura de bolores e/ou leveduras e um ou mais ingredientes alimentícios. Da mesma forma, é possível submeter os bolores e/ou leveduras ao tratamento sub-letal durante os diferentes estágios do processo de preparação, por exemplo, ao primeiro tratar os bolores e/ou leveduras e subsequente tratar o produto comestível contendo os bolores e/ou leveduras tratados.

Qualquer tratamento sub-letal apropriado pode ser utilizado de acordo com a presente invenção. As referências *Basic aspects of food preservation by hurdle technology* por Leistner., L. Int Journal of Food Microbiology 55 (2000) 181- 186 e *Combined methods for food preservation*, por Leistner., L. 1999 em *Handbook of Food Preservation*, Shafiur Rahman., M. (ed.) Marcel Dekker, Nova Iorque, EUA, 457-485, descreve tratamentos sub-letais apropriados que podem ser utilizados e são incorporados como referência no presente.

Tipicamente, o método emprega pelo menos dois tratamentos sub-letais, em que pelo menos um tratamento sub-letal, quando aplicado como

um tratamento único de bolores e/ou leveduras viáveis reduz a capacidade de replicação de ditos bolores e/ou leveduras viáveis em pelo menos 5%. Conseqüentemente, o presente método compreende vantajosamente submeter os bolores e/ou leveduras viáveis a pelo menos dois tratamentos sub-letais, pelo menos um dos tratamentos sub-letais é capaz de reduzir a capacidade de replicação de bolores e/ou leveduras viáveis (original) em pelo menos 5%, de preferência, em pelo menos 10%. A capacidade de replicação de uma população de bolores e/ou leveduras é adequadamente determinada pelo método de contagem de bolores e/ou leveduras conforme mencionado acima.

Os inventores revelaram de modo inesperado que os bolores e/ou leveduras pode se tornar efetivamente não viáveis ao submetê-los a um tratamento sub-letal que dificilmente (ou não) afeta a capacidade de replicação e outro tratamento sub-letal que reduz a capacidade de replicação de bolores e/ou leveduras viáveis (original) em pelo menos 5% (por exemplo, menos de 5 – 50%). Em particular, foi revelado que os bolores e/ou leveduras podem se tornar não viáveis pela combinação de um pH baixo que, em si, dificilmente afeta a capacidade de replicação com outro tratamento sub-letal que é capaz de reduzir a capacidade de replicação em pelo menos 5%. De preferência, estes tratamentos sub-letais ocorrem pelo menos parcialmente de maneira simultânea.

De acordo com uma realização particularmente preferida, o presente método emprega pelo menos dois tratamentos sub-letais que cada um em si é capaz de reduzir a capacidade de replicação de bolores e/ou leveduras viáveis (original) em pelo menos 5%, de preferência, em pelo menos 10%.

Em outra realização preferida, o presente método emprega dois ou mais tratamentos sub-letais que, cada um em si reduz a capacidade de replicação de bolores e/ou leveduras viáveis em não mais do que 60%, de preferência, em não mais do que 50%. Em uma outra realização preferida, o

método utiliza dois ou mais tratamentos sub-letais, em que a soma das porcentagens de redução na capacidade de replicação observadas para cada tratamento sub-letal não excede 60%, de maior preferência, não excede 50%. Um exemplo de um método que satisfaz esta exigência é um método que

5 emprega um tratamento sub-letal que gera em si uma redução na capacidade de replicação de, por exemplo, 10% e outro tratamento sub-letal que, *per se*, gera uma redução na capacidade de replicação de, por exemplo, 5%. Enquanto que a soma das porcentagens de redução da capacidade de replicação para estes dois tratamentos sub-letais é apenas de 15%, a combinação de ditos

10 tratamentos de acordo com a presente invenção gera uma redução geral na capacidade de replicação de, por exemplo, 95% ou mais.

De acordo com outras realizações vantajosas da presente invenção, o presente método compreende:

(a) submeter os bolores e/ou leveduras viáveis que fornecem dito

15 benefício à saúde a pelo menos dois tratamentos sub-letais e subsequëntemente colocar em contato os bolores e/ou leveduras não viáveis produzidos, desta forma, com um produto comestível ou pelo menos um de seus ingredientes, ou

(b) colocar em contato os bolores e/ou leveduras viáveis que

20 fornecem dito benefício à saúde com um produto comestível e subsequëntemente submeter o produto comestível que compreende os bolores e/ou leveduras viáveis a pelo menos dois tratamentos sub-letais, ou

(c) colocar em contato os bolores e/ou leveduras viáveis que fornecem dito benefício à saúde com pelo menos um ingrediente de um

25 produto comestível e subsequëntemente submeter à mistura de bolores e/ou leveduras viáveis e de ingredientes a pelo menos dois tratamentos sub-letais.

É preferível que cada uma de duas ou mais etapas de tratamento sub-letais sejam independentemente selecionadas a partir de:

- (i) aplicação de pressão,
- (ii) ajuste de pH,
- (iii) ajuste da pressão osmótica,
- (iv) aquecimento,
- 5 (v) homogeneização,
- (vi) ciclos de congelamento – descongelamento,
- (vii) secagem por aspersão,
- (viii) adição de um ou mais agentes que possuem um efeito fungicida,
- 10 (ix) aplicação de um campo elétrico pulsado.

As condições apropriadas alternativas para a realização de cada uma das etapas sub-letais serão conhecidas pelo técnico no assunto. É preferível que os tratamentos sub-letais sejam independentemente selecionados a partir do seguinte:

- 15 (i) Aplicação uma pressão de 150 MPa a 400 MPa de -30° C a 25° C por entre 20 a 60 segundos,
- (ii) Ajuste do pH a um intervalo de pH 3 a 4 ou de pH 9 a 10,
- (iii) Ajuste da pressão osmótica pela adição de uma quantidade apropriada de um sal de metal alcalino ou alcalino terroso,
- 20 (iv) Aquecimento de uma temperatura de 15° C a 25° C, de preferência, de 15° C a 20° C acima da temperatura de crescimento ótima para os bolores e/ou leveduras por entre 5 a 10 minutos,
- (v) Homogeneização de 20 a 30 bar (2×10^6 a 3×10^6) de 10° C a 15° C acima da temperatura de crescimento ótima para os bolores e/ou
- 25 leveduras por entre 1 a 5 minutos,
- (vi) Submeter a uma etapa de congelamento e subsequente etapa de descongelamento por entre 5 a 25 ciclos,
- (vii) Adição de uma quantidade apropriada de um ou mais

agente(s) que possuem um efeito fungicida e que são selecionados a partir do sorbato de sódio, quitinase e β -1,3-glucanase,

(viii) Aplicação de um campo elétrico pulsado utilizando entre 15 a 100 kV/ cm com um comprimento de pulso entre 1 a 10 μ s de 10° C a 50° C.

5 Dos citados acima, os tratamentos de maior preferência são o tratamento por temperatura, tratamento por pressão, o ajuste de pH, ciclo de congelamento – descongelamento e tratamento fungicida.

Outro tratamento sub-letal poderia ser utilizado para o uso da irradiação contanto que o tratamento de radiação fosse controlado, tal que um
10 resultado sub-letal fosse obtido. As condições apropriadas para o tratamento de irradiação sub-letal incluem a irradiação de 0,1 a 1 Megarad, utilizando uma fonte de ^{137}Cs em uma taxa de 8 Gy/ min durante a noite. Entretanto, é preferível que os tratamentos sub-letais de acordo com a presente invenção não incluam mais do que um tratamento de irradiação sub-letal.

15 De acordo com uma realização da presente invenção, o fabricante do produto comestível poderia realizar o primeiro tratamento sub-letal e o consumidor do produto comestível poderia realizar o segundo tratamento sub-letal para o consumo do produto.

BOLORES E/OU LEVEDURAS BENÉFICAS

20 Quaisquer bolores e/ou leveduras que fornecem um benefício à saúde do indivíduo que os consome podem ser utilizados de acordo com a presente invenção. Estes efeitos benéficos incluem, de preferência, as propriedades modulatórias e antiinflamatórias.

É preferível de acordo com a presente invenção que o benefício à
25 saúde seja um efeito probiótico. É especialmente preferível que as leveduras sejam leveduras probióticas. É ainda preferível que os bolores e/ou leveduras sejam bolores e/ou leveduras não patogênicos.

Os bolores e/ou leveduras utilizados de acordo com a presente

invenção podem ser quaisquer bolores e/ou leveduras convencionais de grau alimentício.

Os exemplos de leveduras de grau alimentício incluem o gênero *Saccharomyces*, *Debaromyces*, *Kluyveromyces* e *Pichia* e, em particular, as
5 espécies *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* e, particularmente especial, a levedura probiótica *Saccharomyces boulardii*.

Os exemplos de bolores de grau alimentício apropriados incluem o gênero *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor* e *Penicillium* e, em especial, as
10 espécies *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *Mucor miehei*.

Deve ser entendido que qualquer um dos bolores e/ou leveduras de grau alimentício mencionados acima podem ser bolores e/ou leveduras geneticamente modificados.

Vantajosamente, a quantidade de bolores e/ou leveduras não
15 viáveis que fornecem um benefício à saúde (ao indivíduo que consome os bolores e/ou leveduras) no produto comestível é de 10^6 e 10^{11} por porção, de maior preferência, de 10^7 a 10^{10} por porção, de maior preferência, de 10^8 a 10^{10} por porção ou por 100 g de produto. Os tamanhos as porções de diversos produtos são dados na Tabela 1.

20 Os bolores e/ou leveduras utilizados de acordo com a presente invenção podem, de acordo com uma realização, ser bolores e/ou leveduras que foram recuperados do fluxo de resíduos de outra operação de processamento alimentício.

Os bolores e/ou leveduras podem ser colocados em contato com
25 o produto comestível ou um ou mais de seus ingredientes por quaisquer meios apropriados, por exemplo, pela mistura com estes ou sendo aplicada como um revestimento ao mesmo, ou sozinho ou com outro ingrediente, por exemplo, como uma solução. Por exemplo, no processo de fabricação de um produto de

padaria, os bolores e/ou leveduras não viáveis pode ser adicionados à massa de farinha, seguido pelo cozimento da massa de farinha no forno para preparar o produto final. Em outro exemplo, os bolores e/ou leveduras não viáveis podem ser adicionados à mistura prévia gelada seguida pela etapa de
5 tratamento a quente (opcional) e pelo congelamento para produzir uma sobremesa gelada. Alternativamente, e especialmente onde os bolores e/ou leveduras foram tornados não viáveis antes de colocar em contato com o produto comestível ou um de seus ingredientes, os bolores e/ou leveduras pode ser colocados em contato com o produto/ ingrediente por meio de uma
10 embalagem apropriada. Isto pode ser obtido, por exemplo, ao possuir os bolores e/ou leveduras não viáveis presentes em uma parte da embalagem do produto (tal como um canudo ou tampa do recipiente) tal que o produto/ ingrediente entre em contato com os bolores e/ou leveduras não viáveis no egresso do produto da embalagem.

15

EFEITOS BENÉFICOS DOS BOLORES E/OU LEVEDURAS

Os bolores e/ou leveduras não viáveis de acordo com a presente invenção estão suficientemente intactos para evitar ou retardar a desintegração no trato intestinal distal, permitindo desta maneira a interação de seus denominados padrões microbianos conservados, tal como constituintes da
20 parede celular, tal como β -glucanos e DNA não metilado, com os denominados receptores de reconhecimento padrão do sistema imune (mucosa), tal como receptores do tipo Toll e receptores Nod. Estas interações podem resultar na modulação benéfica da função imune que poderia resultar em, por exemplo, maior resistência às infecções, supressão das respostas inflamatórias e alívio
25 ou prevenção de alergias ou doenças auto-imunes.

PRODUTOS COMESTÍVEIS

O produto comestível de acordo com a presente invenção pode ser qualquer produto comestível incluindo os produtos alimentícios e as

bebidas e suplementos alimentares (que são destinados a serem tomados como suplemento com outros alimentos e não se destinam a serem consumidos como o produto alimentício *per se*). Os exemplos de suplementos alimentares são os suplementos vitamínicos e minerais e similares. É
 5 preferível, de acordo com a presente invenção que o produto comestível seja um produto alimentício ou uma bebida.

Diferentes tipos de produtos alimentícios podem ser preparados de acordo com a presente invenção, por exemplo, substituintes de refeições e outros produtos a seres utilizados em um programa de perda de peso, sopa de
 10 carne com vegetais, macarrões, sorvetes, molhos, molhos para salada, temperos, espalháveis, tais como margarina, lanches, cereais incluindo os produtos cereais, tais como mingau, bebidas incluindo bebidas contendo frutas e/ou vegetais, doces ou decoração aromática, pão e produtos de pão tais como *croutons*, biscoitos e outros produtos de padaria, doces, produtos em barra,
 15 chocolate, goma de mascar e produtos lácteos. Os diferentes tipos de bebidas podem ser preparados de acordo com a presente invenção, por exemplo, sopas, bebidas prontas para beber e bebidas em pó. As bebidas podem ser com base em proteína, tais como produtos com base em soja e produtos lácteos, ou podem ser refrigerantes que não são baseados em proteínas.

20 Para os produtos comestíveis que compreendem leveduras, é preferível que os produtos sejam selecionados a partir de produtos com base em massa de farinha, tais como pães, produtos cereais fermentados tais como mingau, *kenkey* ou *mahewu*; bebidas fermentadas que podem ser alcoólicas, tais como cervejas, e produtos lácteos fermentados, tal
 25 como *kefir*.

A Tabela 1 indica uma série de produtos, que podem ser preparados de acordo com a presente invenção, e seu tamanho de porção típica.

TABELA 1

Produto	Tamanho da porção típica
Margarina e outros espalháveis	15 g
Sorvetes e outros produtos de confeitaria congelados	150 g
Molhos para salada e patês	30 g
Produtos em barra e lanches incluindo os produtos substituintes das refeições	75 g
Bebidas substituintes das refeições	330 ml
Produtos de bebida em dose, incluindo produtos de bebida em dose com base em frutas e vegetais	100 ml
Bebidas (bebidas em doses ou bebidas não substituintes da refeição)	200 ml
Biscoitos	20 g
Iogurtes e outras sobremesas com base em soja ou produto lácteo	150g

De acordo com uma realização em que o ajuste de pH é utilizado como um dos tratamentos sub-letais, a presente invenção é especialmente apropriada para a preparação de produtos comestíveis que possuem um pH em que os bolores e/ou leveduras que fornecem um benefício à saúde não são normalmente estáveis. Em particular, a presente invenção pode ser utilizada vantajosamente para a preparação de produtos comestíveis que possuem um pH de 4 ou menos, por exemplo, de 3,8 a 2,0, de maior preferência, de 3,5 a 2,5, de maior preferência, ainda, de 3,3 a 2,8. Os exemplos de tais produtos são as bebidas, por exemplo, alguns refrigerantes, por exemplo, do tipo cola ou sucos de fruta/ vegetais ou bebidas com base em frutas/ vegetais, tais como limão ou suco de laranja.

Conseqüentemente, em outro aspecto a presente invenção se refere a um produto comestível que possui um pH de 4 ou menos e feito pelo método da presente invenção.

Os produtos comestíveis podem compreender uma fonte de fermentação. Por exemplo, o produto alimentício da presente invenção já pode ser fermentado antes da adição dos bolores e/ou leveduras de acordo com a presente invenção, tal como vegetais em salmoura ou uma variedade de alimentos nativos.

MARGARINAS E OUTROS ESPALHÁVEIS

Tipicamente, estas são emulsões óleo-em-água ou água-em-óleo; também são abrangidos os espalháveis que são substancialmente livres de gordura. Tipicamente, estes produtos são espalháveis e não são fluidos na temperatura de uso, por exemplo, de 2 a 10° C. Os níveis de gordura podem variar dentro de um amplo intervalo, por exemplo, margarinas com muita gordura com 60 a 90% em peso de gordura, margarina com gordura média, com 30 a 60% em peso de gordura, produtos com pouca gordura com 10 a 30% em peso de gordura e margarinas livres de gordura ou com muito pouca gordura, com 0 a 10% em peso de gordura.

A gordura na margarina ou outro espalhável pode ser qualquer gordura comestível, e são freqüentemente utilizados o óleo de soja, o óleo de colza, o óleo de girassol e o óleo de palma. As gorduras podem ser utilizadas como tal ou na forma modificada, por exemplo, hidrogenada, esterificada, refinada etc. Outros óleos apropriados são bem conhecidos no estado da técnica e podem ser seleccionados conforme desejado.

O pH de uma margarina ou espalhável pode vantajosamente ser de 5,0 a 6,5.

Os exemplos de espalháveis que não as margarinas são os espalháveis de queijo, espalháveis de doce, espalháveis de iogurte, etc.

Os ingredientes adicionalmente opcionais de espalháveis podem ser os emulsificantes, corantes, vitaminas, conservantes, emulsificantes, gomas, espessantes etc. O balanço do produto normalmente será a água.

Um tamanho típico para uma porção media de margarina ou outro espalhável é de 15 gramas.

PRODUTOS DE CONFEITARIA CONGELADOS

Para o propósito da presente invenção, o termo produto de
5 confeitaria congelado inclui confeitos congelados que contêm leite, tal como sorvete, iogurte gelado, sorvete de frutas, *sorbet*, pudim gelado e sorvete de leite (*ice milk*), sorvete de água, granita e purês de fruta congelado.

De preferência, o nível de sólidos no confeito congelado (por exemplo, açúcar, gordura, aromatizante etc) é mais do que 3% em peso, de
10 maior preferência, de 10 a 70% em peso, por exemplo, de 40 a 70% em peso.

O sorvete irá compreender tipicamente de 2 a 20% em peso de gordura, de 0 a 20% em peso de adoçantes, de 2 a 20% em peso de componentes de leite sem gordura e componentes opcionais, tais como emulsificantes, estabilizantes, conservantes, ingredientes aromatizantes, vitaminas, minerais, etc,
15 sendo o balanço de água. Tipicamente o sorvete será aerado, por exemplo, a uma expansão de 20 a 400%, em geral, de 40 a 200% e congelado a uma temperatura de - 2 a - 200° C, em geral, de - 10 a - 30° C. O sorvete compreende normalmente cálcio em um nível de cerca de 0,1% em peso.

Um tamanho típico de uma porção média de material de
20 confeitaria congelado é de 150 g.

MOLHOS PARA SALADA E PATÊ

Em geral, os molhos para salada (incluindo maionese) ou patês são emulsões de óleo-em-água. A fase óleo da emulsão compreende em geral de 0 a 80% em peso do produto. O nível de gordura é tipicamente de 10 a 80%
25 dependendo do tipo de molhos para salada ou patês. Os molhos para salada com pouca ou nenhuma gordura podem, por exemplo, conter níveis de triglicerídeos de 0, 5, 10, 15% em peso.

Os molhos para salada e patês são, em geral, produtos de pH

baixo possuindo um pH preferido de 2 a 6.

Os molhos para salada ou patês podem conter, opcionalmente, outros ingredientes, tais como emulsificantes (por exemplo, gema de ovo), estabilizantes, acidificantes, biopolímeros, agentes de volume, flavorizantes, agentes corantes, etc. O balanço da composição é a água que poderia
5 vantajosamente estar presente em um nível de 0,1 a 99,9% em peso, em geral, de 20 a 99% em peso, de maior preferência, de 50 a 98% em peso.

Um tamanho típico para uma porção média de molhos para salada ou patês é de 30 gramas.

10 **LANCHES E PRODUTOS EM BARRA INCLUINDO OS LANCHES SUBSTITUINTES DA REFEIÇÃO E AS BARRAS**

Estes produtos compreendem freqüentemente uma matriz de material comestível em que os bolores e/ou leveduras podem ser incorporados. Por exemplo, a matriz pode ser à base de gordura (por exemplo, chocolate com
15 manteiga de cacau ou chocolate) ou pode ser a base em produtos de padaria (pão, massa de farinha, bolinhos, etc) ou podem ser à base de partículas aglomeradas (arroz, grão, nozes, passas, partículas de frutas).

Os ingredientes adicionais podem ser adicionados ao produto tal como os materiais flavorizantes, vitaminas, minerais, etc.

20 **BEBIDAS SUBSTITUINTES DE REFEIÇÃO E OUTRAS BEBIDAS (INCLUINDO AS DOSES DE BEBIDAS)**

Os bolores e/ou leveduras não viáveis podem ser vantajosamente incluídos nas bebidas, por exemplo, sopas, sucos de fruta e/ou vegetais, refrigerantes, bebidas com base láctea e bebidas com base em soja, etc. As
25 bebidas vantajosas de acordo com a presente invenção são bebidas com base em chá e bebidas substituintes da refeição. Estes produtos serão descritos com mais detalhes abaixo. Será evidente que níveis e composições similares se aplicam a outras bebidas de acordo com a presente invenção.

Para o propósito da presente invenção, o termo “produtos com base em chá” refere-se a produtos que contêm chá ou composições fitoterápicas que substituem o chá, por exemplo, saquinhos de chá, folha de chá, saquinhos de chá fitoterápicos, infusões de chá, chá em pó, chá fitoterápico em pó, chá gelado, chá fitoterápico gelado, chá gelado com gás, infusões fitoterápicas com gás, etc.

Tipicamente, alguns destes produtos da presente invenção podem precisar de uma etapa de preparação pouco antes do consumo, por exemplo, a fabricação de chá corado dos saquinhos de chá, folha de chá, saquinhos de chá fitoterápicos ou infusões fitoterápicas ou a solubilização de chá em pó ou chá fitoterápico em pó. Para estes produtos, é preferível ajustar o nível de bolores e/ou leveduras não viáveis no produto, tal que uma porção do produto final a ser consumido possui os níveis desejados de bolores e/ou leveduras conforme descrito acima.

Para o chá gelado, chá fitoterápico gelado, chá gelado com gás, infusões fitoterápicas com gás, o tamanho típico de uma porção será de 200 mL. Os produtos de doses de bebida são as bebidas que possuem um nível concentrado de pelo menos um ingrediente ativo tal que elas fornecem o benefício completo do ingrediente ativo em um menor volume de bebida, desta forma, eles são, em geral, fornecidos em menores quantidades do que outros tipos de bebidas como uma porção única, uma porção de 100 mL é típica para os produtos em doses.

As bebidas substituintes das refeições são tipicamente baseadas em uma base líquida que pode, por exemplo, ser espessada por meio de gomas ou fibras e, na qual são adicionados coquetéis de minerais e vitaminas. A bebida pode ser aromatizada no sabor desejado, por exemplo, sabor de fruta ou chocolate. Um tamanho de porção típica pode ser de 330 mL.

Para os produtos que são extraídos para obter o produto final, em

geral, o objetivo é assegurar que uma porção compreenda as quantidades desejadas conforme indicado acima. Neste contexto, deve ser avaliado que normalmente, apenas parte dos bolores e/ou leveduras não viáveis presentes no produto a base de chá a ser extraído será eventualmente extraído na bebida de chá final. Para compensar este efeito, em geral, é desejável incorporar nos produtos a serem extraídos, cerca de 2 vezes a quantidade que é desejável obter no extrato.

Para a folha de chá ou os saquinhos de chá, tipicamente, de 1 a 5 gramas de chá seria utilizado para preparar uma única porção de 200 mL.

Se os saquinhos de chá são utilizados, os bolores e/ou leveduras podem ser vantajosamente incorporados no componente de chá. Entretanto, será levado em consideração que para algumas aplicações, pode ser vantajoso separar os bolores e/ou leveduras não viáveis do chá, por exemplo, pela incorporação dos mesmos em um compartimento separado do saquinho de chá ou pela aplicação dos mesmos sobre o papel do saquinho de chá.

BISCOITOS

Os biscoitos de acordo com a presente invenção podem ser de qualquer tipo conforme desejado. Os bolores e/ou leveduras não viáveis de acordo com a presente invenção podem ser incluídos como parte dos biscoitos ou como uma decoração, revestimento ou preenchimento para tal. Um tamanho de porção típico para um biscoito é de 20 g.

IOGURTE E OUTRAS SOBREMESAS COM BASE EM SOJA OU PRODUTO LÁCTEO

O iogurte ou outras sobremesas com base em soja ou produto lácteo, de acordo com a presente invenção podem ser de qualquer tipo conforme desejado. Estes produtos podem ser fermentados por outros bolores e/ou leveduras do que por bolores e/ou leveduras não viáveis de acordo com a presente invenção. Alternativamente, eles podem, pelo menos em parte, ser fermentados pelos bolores e/ou leveduras benéficos de acordo com a presente

invenção, antes de eles se tornarem não viáveis. Um tamanho de porção típico para estas sobremesas é de 150 g.

A presente invenção será agora ilustrada adicionalmente com referência aos exemplos seguintes. Os exemplos adicionais dentro do escopo da presente invenção serão evidentes ao técnico no assunto.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

Os bolores e/ou leveduras das espécies selecionadas que possuem benefícios à saúde (por exemplo, *Kluyveromyces lactis*,
10 *Kluyveromyces fragilis*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*,
Saccharomyces boulardii, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *Mucor miehei*) podem ser expostos a dois ou mais de diversos tratamentos sub-letais que, em combinação, geram não viáveis sem perder todas de suas características probióticas.

15 Os bolores e/ou leveduras viáveis em uma concentração de 10^6 a 10^8 cfu/ mL podem;

- (1) permanecer não tratados (controle positivo), ou
- (2) ser incubados a 100° C por 30 minutos (controle negativo), ou
- (3) ser expostos às seguintes combinações de tratamentos sub-

20 letais;

3.1 – aquecer a uma temperatura de 15° C ou 25° C acima da temperatura de crescimento ótima por 5 minutos, seguido pela adição direta de pelo menos uma quitinase entre 1 e 10 ppm, entre 0,9 mM e 5 mM de sorbato de sódio ou entre 1 e 10 ppm de β -1,3-glucanase, ou

25 3.2 – aquecer a uma temperatura de 15° C ou 25° C acima da temperatura de crescimento ótima por 5 minutos, seguido pela aplicação direta de uma pressão de 150 MPa e 400 MPa a 5° C por 20 a 60 segundos, ou

3.3 – aquecer a uma temperatura de 15° C ou 25° C acima da

temperatura de crescimento ótima por 5 minutos, seguido pela aplicação direta de um campo elétrico pulsado utilizando entre 5 e 100 kV/ cm com um comprimento de pulso entre 1 e 10 μ s a 10° C, ou

3.4 – adição de pelo menos uma quitinase entre 1 e 10 ppm, entre 0,9 mM e 5 mM de sorbato de sódio ou entre 1 e 10 ppm de β -1,3-glucanase, seguido diretamente pela aplicação de uma pressão entre 150 MPa e 400 MPa a 5° C por 20 a 60 segundos, ou

3.5 – adição de pelo menos uma quitinase entre 1 e 10 ppm, entre 0,9 mM e 5 mM de sorbato de sódio ou entre 1 e 10 ppm de β -1,3-glucanase, seguido diretamente pela aplicação de um campo elétrico pulsado utilizando entre 15 e 100 kV/ cm com um comprimento de pulso entre 1 e 10 μ s a 10° C.

Seguindo qualquer uma das duas combinações das etapas de tratamento sub-letal 3,1 a 3,5 acima e os tratamentos controle 1 e 2, os bolores e/ou leveduras podem ser contados por uma série de diluições em um meio de diluição apropriado, seguido pelo plaqueamento em meio Agar seletivo por cerca de 24 a 48 horas a 30° C, para estimar o número residual de unidades formadoras de colônias e verificando, assim, a eficiência da geração de bolores e/ou leveduras não viáveis. Outras alíquotas podem ser utilizadas para avaliar a integridade do DNA, por exemplo, por eletroforese em gel de agarose ou por outros meios apropriados conhecidos pelos técnicos no assunto e/ou alíquotas podem ser utilizadas para comparar a atividade imunomoduladora das diferentes preparações de bolores e/ou leveduras.

Um exemplo de avaliar a atividade imunomoduladora é incubar as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) derivadas do sangue de voluntários humanos por diversos períodos (24 a 48 horas) com diluições em série de diferentes preparações de bolores e/ou leveduras, ou com 0,1 a 10 μ g/ ml de DNA isolado de várias preparações de bolores e/ou leveduras. Os eventos de sinalização acionados pela interação destas preparações com o

PBMC humano recentemente isolado podem ser avaliados como a ativação de diversas quinases, translocação de NFκB ou pelos efeitos à jusante (*downstream*) resultantes, tal como a produção de citocina.

Apesar de que seja reconhecido que a sensibilidade de diferentes espécies de bolores e/ou leveduras para combinações distintas de tratamentos sub-letais possa variar, o ensinamento geral é que os bolores e/ou leveduras tratados com calor (tratamento 2 acima) e os bolores e/ou leveduras tratados de acordo com a presente invenção (tratamentos 3,1 a 3,5 acima) se tornam não viáveis. Além disso, os bolores e/ou leveduras não tratados (tratamento 1) e os bolores e/ou leveduras tratados de acordo com a presente invenção (tratamentos 3,1 a 3,5 acima) retêm pelo menos um pouco do efeito modulador na atividade do PBMC humano. Isto indica que os bolores e/ou leveduras submetidos aos tratamentos sub-letais de acordo com a presente invenção (tratamentos 3,1 a 3,5 acima) podem exercer efeitos benéficos quando administrados no contexto de um produto alimentício sem trazer todos os problemas associados com a utilização de bolores e/ou leveduras vivos. Entretanto, este não é o caso de quando os bolores e/ou leveduras se tornam não viáveis pelos tratamentos letais, tal como um tratamento a quente convencional (tratamento 2).

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE UM PRODUTO COMESTÍVEL, caracterizado pelo fato de que compreende bolores e/ou leveduras não viáveis, cujos bolores e/ou leveduras são substancialmente intactos na estrutura e que fornecem um benefício à saúde ao indivíduo que consome os bolores e/ou leveduras, em que o método compreende submeter os bolores e/ou leveduras viáveis a pelo menos dois tratamentos sub-letais para obter os bolores e/ou leveduras não viáveis fornecendo um benefício à saúde, cada tratamento sub-letal independentemente não sendo suficiente para gerar os bolores e/ou leveduras não viáveis.
2. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende submeter os bolores e/ou leveduras viáveis a pelo menos dois tratamentos sub-letais, pelo menos um dos tratamentos sub-letais é capaz de reduzir a capacidade de replicação de bolores e/ou leveduras viáveis em pelo menos 5%, de preferência em pelo menos 10%.
3. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que compreende submeter os bolores e/ou leveduras viáveis a pelo menos dois tratamentos sub-letais, em que a soma das porcentagens de redução na capacidade de replicação observada para cada tratamento sub-letal não excede 60%.
4. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o produto comestível é um produto alimentício ou uma bebida.
5. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que o benefício à saúde é um efeito probiótico.
6. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que os bolores e/ou leveduras são bolores e/ou leveduras não patogênicos.

7. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações de 1 a 6, caracterizado pelo fato de que os bolores e/ou leveduras retêm padrões microbianos conservados que podem ser reconhecidos pelos receptores de reconhecimento padrão do sistema imune.

5 8. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que os padrões microbianos conservados compreendem DNA e/ou constituintes da parede celular.

9. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que os bolores são selecionados a partir do gênero
10 *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor* e *Penicillium*.

10. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que as espécies de bolores são selecionadas a partir de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *Mucor miehei*.

11. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que as leveduras são selecionadas a partir do
15 gênero *Saccharomyces*, *Debaromyces*, *Kluyveromyces* e *Pichia*.

12. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que as espécies de leveduras são selecionadas a partir de *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Pichia pastoris*,
20 *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii*.

13. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que o produto comestível contém entre 10^6 e 10^{11} bolores e/ou leveduras por porção.

14. MÉTODO, de acordo com uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que compreende:
25

(a) submeter os bolores e/ou leveduras viáveis que fornecem dito benefício à saúde a pelo menos dois tratamentos sub-letais e subsequente colocar em contato os bolores e/ou leveduras não viáveis

produzidos, desta forma, com um produto comestível ou pelo menos um de seus ingredientes, ou

(b) colocar em contato os bolores e/ou leveduras viáveis que fornecem dito benefício à saúde com um produto comestível e
5 subsequêntemente submeter o produto comestível que compreende os bolores e/ou leveduras viáveis a pelo menos dois tratamentos sub-letais, ou

(c) colocar em contato os bolores e/ou leveduras viáveis que fornecem dito benefício à saúde com pelo menos um ingrediente de um produto comestível e subsequêntemente submeter à mistura de bolores e/ou
10 leveduras viáveis e de ingredientes a pelo menos dois tratamentos sub-letais.

15. MÉTODO, de acordo uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que cada um dos dois ou mais tratamentos sub-letais é selecionado independentemente a partir de:

- (i) aplicação de pressão,
- 15 (ii) ajuste de pH,
- (iii) ajuste da pressão osmótica,
- (iv) aquecimento,
- (v) homogeneização,
- (vi) ciclos de congelamento – descongelamento,
- 20 (vii) secagem por aspersão,
- (viii) adição de um ou mais agentes que possuem efeito fungicida,
- (ix) aplicação de um campo elétrico pulsado.

16. MÉTODO, de acordo uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado pelo fato de que cada um dos dois ou mais tratamentos sub-
25 letais é selecionado independentemente a partir de:

- (i) Aplicação uma pressão de 150 MPa a 400 MPa de -30° C a 25° C por entre 20 a 60 segundos,
- (ii) Ajuste do pH a um intervalo de pH 3 a 4 ou de pH 9 a 10,

(iii) Ajuste da pressão osmótica pela adição de uma quantidade apropriada de um sal de metal alcalino ou alcalino terroso,

(iv) Aquecimento de uma temperatura de 15°C a 25°C acima da temperatura de crescimento ótima para os bolores e/ou leveduras por entre
5 5 a 10 minutos,

(v) Homogeneização de 20 a 30 bar (2×10^6 a 3×10^6) de 10°C a 15°C acima da temperatura de crescimento ótima para os bolores e/ou leveduras por entre 1 a 5 minutos,

(vi) Submeter a uma etapa de congelamento e subsequente
10 etapa de descongelamento por entre 5 a 25 ciclos,

(vii) Adição de uma quantidade apropriada de um ou mais agente(s) que possuem um efeito fungicida e que são selecionados a partir do sorbato de sódio, quitinase e β -1,3-glucanase,

(viii) Aplicação de um campo elétrico pulsado utilizando entre 15
15 a 100 kV/ cm com um comprimento de pulso entre 1 a 10 μ s de 10° C a 50° C.

17. PRODUTO COMESTÍVEL, caracterizado pelo fato de ser capaz de ser obtido pelo processo conforme descrito em uma das reivindicações de 1 a 16.

18. PRODUTO COMESTÍVEL, de acordo com a reivindicação
20 17, caracterizado pelo fato de que dito produto é um produto alimentício ou uma bebida.

RESUMO**“MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE UM PRODUTO COMESTÍVEL E PRODUTO COMESTÍVEL”**

A presente invenção refere-se a um método para a preparação de um produto comestível que compreende bolores e/ou leveduras não viáveis que são substancialmente intactas na estrutura e que fornecem um benefício à saúde, o método compreende submeter os bolores e/ou leveduras viáveis a pelo menos dois tratamentos sub-letais para obter os bolores e/ou leveduras não viável fornecendo um benefício à saúde, cada tratamento sub-letal independentemente não sendo suficiente para gerar os bolores e/ou leveduras não viáveis.