



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 1003831-0 B1



(22) Data do Depósito: 08/10/2010

(45) Data de Concessão: 02/07/2019

(54) Título: MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UM PÓ DE MINHOCA SECO

(51) Int.Cl.: A61K 35/56; A61K 9/14.

(30) Prioridade Unionista: 13/10/2009 JP 2009-236514.

(73) Titular(es): WELL STONE CO..

(72) Inventor(es): YOICHI ISHII; KAZUYUKI ISHII; HIROYUKI SUMI; ETSUO YOSHIDA; SAYAKA ISHII.

(57) Resumo: MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UM PÓ DE MINHOCA SECO . É fornecido um método de produção simples e fácil de um pó de minhoca seco inofensivo, ao suprimir a inativação das enzimas contidas nas minhocas. No método, um homogenato obtido através da trituração das minhocas vivas é submetido à secagem por congelamento e o produto seco é tratado por aquecimento a uma temperatura de 110198>C, ou mais elevada, porém mais baixa que 130198>C. De preferência, o método de acordo com a presente invenção compreende adicionalmente um processo para a preparação das minhocas vivas, que precede a etapa de trituração, que compreende as etapas de: manter as minhocas vivas sob luz por 10 a 50 horas; remover a sujeira formada na pele das mesmas, colocar as minhocas em contato com um ácido orgânico por 30 segundos, ou menos; diluir o ácido com a adição de água para ajustar o pH da solução ácida aquosa a um pH que se situa na faixa de 2 a 5; manter a mistura de minhoca sob a condição de pH por 3 a 180 minutos; e, então, lavar as minhocas com água.

"MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UM PÓ DE MINHOCAS SECO"

A presente invenção refere-se a um método de produção de um pó de minhoca seco, em particular, a um método de produção de um pó de minhoca seco inofensivo ao suprimir a inativação das enzimas contidas em
5 uma minhoca.

As minhocas são usadas desde os tempos antigos em países orientais como fármacos para a prevenção e tratamento de várias doenças, e se encontraram aplicações como agente estimulante de liberação e
10 contração do cálculo intracístico, agente anti-colopatia, parturifaciente, tônico, tônico para crescimento capilar, contaminação, antifebril, agente para tratamento de espasmos, acelerador de fluxo sanguíneo, agente para tratamento de hemiplegia, analgésico indireto, agente de melhoramento de urinação, agente anti-asma bronquial, agente anti-hipertensão e outros.

É necessário remover a sujeira da minhoca que permanece nos
15 tratos digestivos, o depósito sobre a pele, e outros para a produção de um remédio para administração oral através da utilização da minhoca como a matéria-prima, e vários métodos para este propósito foram apresentados.

Os exemplos dos mesmos propostos até o momento incluem métodos de produção de um pó de minhoca seco útil como um agente
20 anti-diabetes, agente anti-hiperlipidemia ou agente para ajuste de pressão sanguínea, através da imersão de corpos vivos de minhocas em uma solução aquosa de um sal alcalino como sal de sódio ou sal de potássio, de modo a permitir que as mesmas excretem o cálculo nos tratos digestivos, da trituração a molhado das minhocas e da secagem por congelamento da
25 suspensão obtida deste modo sob vácuo (JP64-47718A, JP64-47719A, JP64-47720A e JP01-268639A), e um método de produção de um remédio para pacientes com trombose, através da imersão de corpos vivos de minhocas em uma solução ácida aquosa mantida de 6 a 26°C por 0,1 a 5
horas, de modo a permitir que as mesmas excretem o cálculo nos tratos

digestivos, triturar as minhocas, desgaseificar o homogenato e secar a vácuo o homogenato, enquanto a temperatura é elevada gradualmente (JP03-72427A).

Os inventores também propuseram um método para fazer com a minhoca excrete seu conteúdo no trato digestivo ao colocar a minhoca sob um ambiente em condição de habitat desagradável gerado como ácido orgânico (JP2008-081476A).

No entanto, os pós de minhoca produzidos através dos métodos de produção convencionais têm um problema de que os micróbios contidos na minhoca não são suficientemente esterilizados, dependendo da etapa de secagem através da secagem por congelamento a vácuo e similares. Embora sejam tomadas as medidas como esterilização a álcool, estas medidas também têm problemas de trabalho aumentado e período alongado e, então, de custo aumentado e, portanto, houve uma demanda por medidas que resolvessem os problemas.

Um objetivo da presente invenção é fornecer um método de produção simples e fácil de um pó de minhoca seco inofensivo, ao suprimir a inativação das enzimas contidas na minhoca.

Após estudos intensivos para resolver o problema acima, os inventores concluíram que é possível resolvê-lo através do aquecimento do pó de minhoca a uma temperatura particular após secagem por congelamento, e propuseram a presente invenção.

Geralmente, as enzimas são comumente conhecidas por serem frágeis ao aquecimento, a exceção daquelas em alguma bactéria termofílica e, então, o termotratoamento até cerca de 80°C foi conduzido, porém o termotratoamento a uma temperatura mais elevada que isto ainda não foi discutido. Contudo, os inventores focaram no fato de que o termotratoamento é mais seguro, mais simples e mais conveniente método dentre os métodos estudados de esterilização de um pó de minhoca e

estudaram a temperatura de aquecimento mais adequada. Como resultado, os mesmos concluíram que a atividade das enzimas contidas em um pó de minhoca foi preservada mesmo se o pó de minhoca foi aquecido a uma temperatura drasticamente mais elevada que aquela usada em outros métodos.

Especificamente, o método de produção de um pó de minhoca seco, de acordo com a presente invenção compreende as etapas de triturar minhocas vivas em um homogenato; secar por congelamento o homogenato; e tratar por aquecimento o produto submetido à secagem a uma temperatura que se situa na faixa de 110°C ou mais elevada, porém mais baixa que 130°C.

De preferência, o método de produção de um pó de minhoca seco, de acordo com a presente invenção, compreende adicionalmente um processo para preparação das minhocas vivas, que precede a etapa de trituração, que compreende as etapas de:

manter as minhocas vivas sob luz por 10 a 50 horas;

remover a sujeira formada na pele das mesmas,

colocar as minhocas em contato com um ácido orgânico por 30 segundos ou menos;

diluir o ácido com a adição de água para ajustar o pH da solução ácida aquosa a um pH que se situa na faixa de 2 a 5;

manter a mistura de minhoca sob a condição de pH por 3 a 180 minutos; e, então, lavar as minhocas com água.

Alternativamente, o método de produção de um pó de minhoca seco, de acordo com a presente invenção, compreende adicionalmente um processo de preparação das minhocas vivas, que precede a etapa de trituração, que compreende as etapas de:

manter as minhocas vivas sob luz por 10 a 50 horas;

remover a sujeira formada na pele das mesmas,

imersar as minhocas em uma solução de um ácido orgânico que tem um pH previamente ajustado que se situa na faixa de 2 a 5;

manter a mistura de minhoca sob a condição de pH por 3 a 180 minutos; e, então, lavar as minhocas com gua.

5 Além disso, p método de produção de um p de minhoca seco, de acordo com a presente invenção, compreende adicionalmente um processo para a preparação das minhocas vivas, que precede a etapa de trituração, que compreende as etapas de:

manter as minhocas vivas sob luz por 10 to 50 horas;

10 remover a sujeira formada na pele das mesmas,

colocar as minhocas em contato com um p de ácido hidroxicarboxílico cristalino por 30 segundos ou menos;

diluir o ácido com a adição de água para ajustar o pH da solução ácida aquosa a um pH que se situa na faixa de 2 a 5;

15 manter a mistura de minhoca sob a condição de pH por 3 a 180 minutos; e, então, lavar as minhocas com gua.

Adicionalmente, no método de produção de um p de minhoca seco, de acordo com a presente invenção, é preferível que a lavagem com água seja executada com água que contenha bolhas em micro-nano.

20 Mais adicionalmente, no método de produção de um p de minhoca seco, de acordo com a presente invenção, é preferível que a secagem por congelamento seja executada sob vácuo após o homogenato ser congelado a -18°C a -35°C por 20 a 240 horas.

25 A presente invenção pode fornecer um método de produção simples e fácil de um p de minhoca seco inofensivo ao suprimir a inativação das enzimas contidas na minhoca.

No desenho:

A Figura 1, é um gráfico que mostra os resultados nos Exemplos 1 e 2 e o Exemplo Comparativo 1.

Doravante, será descrito detalhadamente o método de produção de um pó de minhoca seco, de acordo com a presente invenção.

No método de acordo com a presente invenção, as minhocas vivas são usadas como a matéria-prima, e exemplos das minhocas vivas incluem *Lumbricus rubellus*, *Lumbricus terrestris*, *Eisenia foetida*, *Allolobophora caliginosa*, *Dendrobaena octaedra*, *Allolobophora japonica* Michaelsen, *Drawida hattamimizu* Hatai, *Pheretima divergens* Michaelsen, *Pheretima communissima*, *Pheretima agrestis*, *Pheretima sieboldi* Horst, *Pheretima hilgendorfi*, *Pontodrilus matsushimensis* Iizuka, *Tubifex hattai* Nomura, *Limnodrilus gotoi* Hatai (*L. socialis* Stephenson) e assim por diante.

A preparação das minhocas vivas para o uso no método inventivo antes da trituração não é, em particular, limitada, porém pode ser executada, por exemplo, da seguinte forma. Primeiramente, as minhocas vivas coletadas de um leito de cultivo são transferidas para uma caixa plana como uma caixa de pão, e são mantidas na mesma por 10 a 50 horas, de preferência, por um dia. O conteúdo das minhocas vivas na caixa deve ser uma quantidade que corresponde a uma espessura de 30 a 60 mm, de preferência, 40 a 50 mm. Devem ser prestados os cuidados para assegurar que nenhum material do exterior como areia e lama permaneçam na caixa plana, e a caixa plana deve ser mantida iluminada à noite, como nas culturas sob iluminação, devido ao fato de que as minhocas são noturnas e ativas em atividade de vida em local escuro e, deste modo, se pode consumir sua força física. As minhocas vivas mostram sua função de auto-proteção sob o tratamento, para preservar seu ambiente de vida ao excretar o material da digestão que permanece nos tratos digestivos, cobrir todo o corpo com a excreção e, deste modo, evitar a vaporização da água, e é finalmente possível remover quase que completamente o material da digestão nos tratos digestivos e os corantes depositados em suas peles, ao

remover os corantes, isto é, a excreção, cobrindo as minhocas repetidamente através da utilização um meio adequado. A remoção dos corantes depositados sobre a pele pode ser executada ao cobrir as minhocas vivas, por exemplo, com um tecido não-tecido e permitindo, 5 deste modo, a absorção dos corantes.

Então, as minhocas vivas, das quais os corantes foram removidos, são, de preferência, expostas diretamente a um ambiente de vida desagradável às minhocas vivas. Tal tratamento faz com que as minhocas tentem aprimorar o ambiente de vida ao excretar o fluido 10 corpóreo através da sua função de auto-proteção e, deste modo, é possível fazer com que as minhocas excretem não apenas o material da digestão remanescente nos tratos digestivos, mas também amônia, uma causa de odor asqueroso, bem como o fluido corpóreo que contém arsênico que é tóxico ao corpo.

15 Um exemplo do método de geração de um ambiente de vida desagradável é fazer com que as minhocas vivas entrem em contato com um ácido orgânico. Um ambiente de vida desagradável para as minhocas vivas pode ser formado imediatamente ao colocar as minhocas em contato com o ácido orgânico. Quanto para o contato com o ácido orgânico, um pó 20 de ácido orgânico pode ser diretamente aspergido ou como uma solução de ácido orgânico aquosa concentrada nas minhocas vivas. Os exemplos dos ácidos orgânicos usados incluem, então, ácido acético, ácido málico, ácido cítrico, ácido lático, ácido malônico, ácido succínico e similares. Estes ácidos podem ser usados sozinhos ou como uma mistura de dois ou mais 25 ácidos. O ácido orgânico particularmente favorável é o ácido cítrico. Se for gerado tal ambiente de vida desagradável conforme descrito acima, um contato prolongado entre as minhocas vivas e um pó de ácido orgânico ou uma solução de ácido orgânico aquosa concentrada induz a morte das minhocas com perda das funções vitais e, deste modo, a não excreção do

material da digestão nos tratos digestivos e, portanto, o ácido orgânico deve ser diluído em água o mais rápido possível, normalmente dentro de 30 segundos ou menos, de preferência, 20 segundos ou menos, para ajustar o pH da solução ácida aquosa a um pH que se situa na faixa de 2 a 5. É preferível o uso da seguinte água em micro-nano que contém bolhas como a água para a diluição do ácido orgânico, devido ao fato de que induz a um aumento da quantidade do fluido corpóreo excretado das minhocas.

Ao invés de colocar as minhocas em contato com o pó de ácido orgânico ou a solução de ácido orgânico aquosa concentrada seguido pela diluição mais rápida possível conforme descrito acima, uma solução de ácido orgânico aquosa pode ser previamente preparada para ter um pH ajustado que se situa na faixa de 2 a 5 e as minhocas podem ser imersas na mesma, e a solução de ácido orgânico aquosa que contém bolhas em micro-nano também pode ser usada. O período em que a minhoca viva exibe a função de auto-proteção varia em certa medida, devido ao fato de que cerca de 65% do tecido de minhoca viva é umidade e, deste modo, há alguma concessão periódica para a função de auto-proteção. Contudo, devido ao fato de que é indesejável a morte das minhocas vivas, cuidados devem ser dados ao controle do período durante o qual as minhocas vivas são colocadas sob um ambiente de vida desagradável. O período pode variar de acordo com a condição usada, mas normalmente se situa na faixa de 3 a 180 minutos. Além da diluição em água, o pH pode ser ajustado através da neutralização com base alcalina ou com o uso de solução tampão. O uso de tal ácido orgânico é eficaz para fazer com que a minhoca excrete o material digestivo remanescente no órgão digestivo, conforme descrito acima e também na esterilização não desejado de micróbios que não podem ser removidos através da lavagem com água devido ao fato da ação microbicida do ácido orgânico.

As minhocas vivas podem ser colocadas em contato com um ácido hidroxicarboxílico, conforme o método de geração de um ambiente de vida desagradável. Neste caso, o contato com with ácido hidroxicarboxílico pode ser executado por qualquer método, mas, de preferência, através da aspersão de um pó de ácido hidroxicarboxílico cristalino sobre as minhocas vivas seguido pela adição de água imediatamente para a diluição do ácido hidroxicarboxílico para ajustar o pH da solução ácida aquosa a um pH que se situa na faixa de 2 a 5 e a mistura de minhoca é armazenada sob a condição de pH por 3 a 180 minutos. O contato prolongado entre as minhocas vivas e o pó de ácido hidroxicarboxílico leva à morte das minhocas com perda das funções vitais e, deste modo, a não excreção do material de digestão nos tratos digestivos e, portanto, o ácido hidroxicarboxílico deve ser diluído em água o mais rápido possível, normalmente dentro de 30 segundos ou menos, de preferência, 20 segundos, ou menos, para ajustar o pH da solução ácida aquosa a um pH que se situa na faixa de 2 a 5. Além da diluição em água, o pH pode ser ajustado da neutralização com base alcalina ou com o uso de solução tampão. É preferível o uso da seguinte água em micro-nano que contém bolhas como a água para a diluição do ácido orgânico, devido ao fato de que a mesma induz a um aumento da quantidade do fluido corpóreo excretado da minhoca. Se for usado tal ácido hidroxicarboxílico, sua forte acidez decompõe a pele das minhocas vivas e sua atividade esterilizadora induz a geração imediata de um ambiente de vida desagradável para as minhocas tal que a minhoca tenta aprimorar o ambiente de vida através da excreção de seu fluido corpóreo sob função de auto-proteção. O tratamento de contato também é eficaz na redução dos micróbios patogênicos contidos no corpo da minhoca. O ácido hidroxicarboxílico, que pode formar compostos complexos com metais pesados, ligações aos metais tóxicos como mercúrio, cádmio e chumbo presentes no corpo da

minhoca, de modo a excretar vantajosamente estes metais para fora do corpo. O ácido hidroxicarboxílico cristalino usado em tal caso não se limita, particularmente, ao número dos grupos de hidroxila ou grupos de carboxila contidos no mesmo, se o composto é cristalino sob a condição utilizada.

- 5 Deste modo, pode ser um ácido monocarboxílico monohidróxi, um ácido policarboxílico monohidróxi, um ácido monocarboxílico polihidróxi ou um ácido policarboxílico polihidróxi. Os exemplos dos ácidos hidroxicarboxílicos incluem ácido glicólico, ácido láctico, ácido β -hidroxipropiônico, ácido α -hidroxi-n-butírico, ácido β -hidroxi-n-butírico, 10 ácido α -hidroxi-n-valérico, ácido β -hidroxi-n-valérico, ácido málico, ácido α -metilmálico, ácido α -hidroxiglutárico, ácido β -hidroxiglutárico, ácido cítrico e similares, dentre os quais o ácido láctico, ácido málico e ácido cítrico são preferíveis, do ponto de disponibilidade. Estes ácidos hidroxicarboxílicos podem ser usados sozinhos ou como uma mistura de 15 dois ou mais ácidos.

Então, os corpos vivos da minhoca, após a remoção praticamente completa dos depósitos, são lavados com água purificada e, então, aterrados em um homogenato do tipo em pasta ou líquido. A trituração é executada, por exemplo, em um homogenizador, um 20 misturador, um misturar para homogeneização do tipo "homomixer", uma máquina de amassar, ou uma fresa celular de alta pressão, normalmente a uma temperatura de 1 a 25°C, de preferência, 2 a 15°C. O homogenato é submetido, então, a secagem por congelamento. Já que as enzimas contidas nos corpos vivos da minhoca estão inativas quando as células 25 ainda estão vivas, mas reagem instantaneamente com as células mortas para gerar calor e odor putrefato forte através da putrefação, para a prevenção disto, é preferível o uso da secagem por congelamento sob processo a vácuo em que o homogenato pode ser rapidamente resfriado a

uma temperatura de -18°C a -35°C a fim de inibir as ações da enzima e a secagem por congelamento.

Para pulverização sem deterioração na ação farmacológica inerente à minhoca, o homogenato deve ser submetido à secagem por congelamento rapidamente, mas, por outro lado, o congelamento extremamente rápido é desfavorável, devido ao fato de que quando o homogenato é congelado em um período de tempo excessivamente curto, as impurezas presentes juntamente com as proteínas, que são o componente principal da pasta de minhoca, podem não ser separadas, enquanto formam regiões descongeladas manchadas. Por este motivo, o congelamento é, de preferência, realizado a uma baixa temperatura de -18°C a -35°C em um período de 20 a 240 horas, mas preferencialmente, de 50 a 170 horas.

Durante secagem por congelamento sob vácuo, importante selecionar uma condição que permita a remoção favorável de água bem como impurezas. Para este propósito, é vantajoso realizar a secagem por congelamento sob vácuo através do aumento gradual da temperatura que se situa na faixa de -60°C a $+90^{\circ}\text{C}$ sob uma pressão de 50 Pa, ou menos, tomando de 10 a 60 horas.

Por exemplo, conforme descrito acima, o homogenato é congelado a uma temperatura de -18°C a -35°C em um período de 20 a 240 horas e é realizada a secagem por congelamento sob vácuo por 10 a 60 horas através da alteração gradual da temperatura e da pressão que se situam na faixa de -60°C a $+90^{\circ}\text{C}$ e 40 a 25 Pa, respectivamente, a fim de obter um pó de minhoca seco amarelo pálido no estado estéril.

As minhocas vivas para uso na presente invenção são, de preferência, lavadas com água, por exemplo, após tal tratamento acima, e antes da pulverização, mas, em tal caso, a água em micro-nano que contém bolhas pode ser usada de maneira favorável como a água usada.

O uso de tal água tem uma vantagem que a eficácia da lavagem é aprimorada. A bolha em micro-nano significa, no presente documento, uma bolha que tem um diâmetro de 0,01 a 100 μm , e a bolha pode ser uma bolha de ar ou uma bolha de oxigênio. A água em micro-nano que contém
5 bolhas pode ser preparada, por exemplo, através de um método de produção das mesmas ao destruir as microbolhas sob alta pressão ou através de um método de produção de bolhas através da utilização de um filme da SPG (shirasu porous glass).—Um exemplo do aparelho que produz a água que contém microbolhas é um sistema de alta qualidade
10 dissolvente/de geração de bolhas dotado de um dispositivo de produção de bolhas em incisão incorporado, como o sistema fabricado pela SPG Technology Co., Ltd.

O método de produção de um pó de minhoca seco, de acordo com a presente invenção, é caracterizado pelo termotratamento de um
15 produto de minhoca seco, que é obtido através da secagem de um homogenato das minhocas vivas lavadas, a uma temperatura de 110°C, ou mais elevada, porém mais baixa que 130°C, de preferência, de 115 a 125°C. Quando a temperatura de aquecimento é mais baixa que 110°C, o produto seco pode ser insuficientemente esterilizado, enquanto, quando é de 130°C,
20 ou mais elevada, as enzimas contidas no produto de minhoca seco pode ser, de modo desfavorável, inativado, o que leva a uma diminuição em suas atividades. O método de aquecimento não se limita, em particular, e exemplos do mesmo incluem métodos para assoprar ar quente, através da utilização de uma jaqueta de aquecimento, ao aquecer através do
25 aquecedor sobre uma bandeja e similares, através da utilização de um forno de temperatura constante e similares.

O período de aquecimento é, de preferência, 30 segundos a 130 minutos, mais preferencialmente, 30 minutos a 90 minutos, e ainda com mais preferência de 60 minutos a 90 minutos. De modo desfavorável, um

período de aquecimento excessivamente curto pode induzir a uma esterilização insuficiente, enquanto um período excessivamente longo à inativação das enzimas.

Aplicabilidade Industrial

5 O pó de minhoca seco produzido pelo método de produção de acordo com a presente invenção é útil, por exemplo, como um agente de ajuste de pressão sanguínea, um agente anti-hiperlipidemia, um agente anti-diabetes e um agente trombolítico, similarmente aos pós de minhoca secos preparados através de métodos convencionais. Também é possível
10 usar os pós como um ingrediente ativo em remédios, cosméticos e suplementos, através da extração do pó, por exemplo, com água purificada ou álcool, centrifugando a solução obtida e fracionando os ingredientes por peso molecular.

Doravante, a presente invenção será especificamente descrita
15 com referência aos Exemplos, mas deve ser compreendido que a invenção não se limita a estes Exemplos.

Preparação de produto de minhoca seco

30 Quilogramas de minhocas vivas do tipo *Lumbricus rubellus* preparadas ao serem mantidas sob luz por 10 a 50 horas e que tem removidas a sujeira formada na pele das mesmas foram colocados e espalhados a uma espessura de aproximadamente 5 cm em uma caixa plana e 250 g de pó de ácido cítrico foi uniformemente aspergido na mesma e, após 15 segundos, o ácido foi diluído em 30 litros de água purificada. O
25 pH da solução ácida aquosa, imediatamente após a adição de água, era de 2,25, enquanto o pH ao final da diluição era de 2,74.

Ao adicionar o pó de ácido cítrico através da aspersão, as minhocas excretaram fluido corpóreo amarelado imediatamente e, deste modo, foram removidos a amônia, a causa do odor nojento, os metais

pesados, como arsênico, perigosos ao corpo, e substância que inibem a hiperfibrinólise.

As minhocas vivas foram, então, separadas da solução de ácido cítrico aquosa suja, lavadas com água e aterradas em uma pasta de minhoca a 10°C através da utilização de um homogenizador. Então, a pasta de minhoca foi desgaseificada sob vácuo, colocada em uma bandeja de aço inoxidável, instantaneamente resfriada a -35°C, e mantida a mesma temperatura, permitindo congelamento gradual em um período de 50 horas.

A secagem por congelamento sob vácuo foi realizada de tal maneira que a pasta de minhoca congelada, deste modo, foi mantida permanentemente a uma de -35°C sob uma de 0 Pa por 2 horas, e a pasta de minhoca congelada foi gradualmente aquecida a uma temperatura de 25°C sob uma pressão de 40 Pa por 10 horas, a uma temperatura de 40°C sob uma pressão de 35 Pa por 14 horas, a uma temperatura de 65°C sob uma pressão de 35 Pa por 12 horas, e finalmente a uma temperatura de 80°C sob uma pressão de 25 Pa por 6 horas. O processo gerou um pó de minhoca seco amarelo pálido dotado de um teor de água de 8 % em massa.

Termotratoamento de produto seco

O pó seco obtido acima foi submetido a um termotratoamento em um aquecedor RM-50D (fabricado pela OKAWARA CORPORATION). A condição de aquecimento era de 110°C, 120°C ou 130°C, conforme descrito abaixo, e uma parte do pó seco foi retirada em um intervalo de 15 minutos após o pó ser aquecido a uma temperatura especificada. Em relação ao pó seco retirado, a atividade enzimática remanescente no pó foi avaliada em um teste através do método de placa de fibrina. Primeiramente, foi adicionado 20 ml de solução salina fisiológica a 1g do pó; a mistura foi agitada a temperatura ambiente e 1500 rpm por 1 hora e centrifugada a 10000 rpm e 4°C por 15 minutos; e o supernadante obtido foi usada como

amostra. No método de placa de fibrina, o fibrinogênio (fabricado por Sigma Aldrich Corporation) foi dissolvido em 10 ml de BSB (solução tampão salina boro-fisiológica, pH 7,8) em uma concentração final de 0,6% e foi adicionada trombina a uma concentração de 5,0 U/ml, para preparação de uma placa de fibrina; 30 µl da amostra foi colocado sobre a placa de fibrina; e a área da janela de fibrinólise gerada após a incubação a 37°C por 4 horas foi determinada. Os resultados obtidos foram sumarizados na Tabela 1 seguinte 1. O teste através do método de placa de fibrina foi repetido três vezes e a área do meio foi determinada. Em adição, o gráfico que mostra os resultados obtidos é mostrado na Figura 1.

Condição de aquecimento

Exemplo 1

Número de Operação	Temperatura	Período de Aquecimento Cumulativo	Período mantido na Temperatura
110-60-0	110°C	60 minutos	0 minuto
110-75-15	110°C	75 minutos	15 minutos
110-90-30	110°C	90 minutos	30 minutos
110-105-45	110°C	105 minutos	45 minutos
110-120-60	110°C	120 minutos	60 minutos
110-135-75	110°C	135 minutos	75 minutos
110-150-90	110°C	150 minutos	90 minutos

Exemplo 2

Número de Operação	Temperatura	Período de aquecimento Cumulativo	Período mantido na Temperatura
120-40-0	120°C	40 minutos	0 minuto
120-55-15	120°C	55 minutos	15 minutos
120-70-30	120°C	70 minutos	30 minutos
120-85-45	120°C	85 minutos	45 minutos
120-100-60	120°C	100 minutos	60 minutos
120-115-75	120°C	115 minutos	75 minutos
120-130-90	120°C	130 minutos	90 minutos

Exemplo Comparativo 1

Número de Operação	Temperatura	Período de aquecimento Cumulativo	Período mantido na Temperatura
130-40-0	130°C	40 minutos	0 minuto
130-55-15	130°C	55 minutos	15 minutos
130-70-30	130°C	70 minutos	30 minutos
130-85-45	130°C	85 minutos	45 minutos
130-100-60	130°C	100 minutos	60 minutos
130-115-75	130°C	115 minutos	75 minutos
130-130-90	130°C	130 minutos	90 minutos

Tabela 1

		Área de Lise, mm ²			
		Meio	Primeiro Tempo	Segundo Tempo	Terceiro Tempo
Controle*		495,0	508,2	488,4	488,4
Exem- plo 1	110-60-0	453,7	440,9	460,1	460,1
	110-75-15	442,5	424,3	443,1	460,1
	110-90-30	427,2	406,0	434,7	441,0
	110-105-45	421,5	422,1	426,2	416,1
	110-120-60	408,7	408,0	422,2	396,0
	110-135-75	412,7	416,0	408,0	414,0
	110-150-90	411,4	406,0	418,2	410,0
Exem- plo 2	120-40-0	421,6	420,2	430,5	414,1
	120-55-15	396,7	398,0	398,0	394,0
	120-70-30	368,1	370,6	355,3	378,3
	120-85-45	361,6	361,0	359,1	364,8
	120-100-60	355,3	351,5	355,3	359,1
	120-115-75	330,0	336,7	325,8	327,6
	120-130-90	322,2	329,4	313,2	324,0
Exemplo Comparativo 1	130-40-0	293,0	294,1	290,7	294,1
	130-55-15	196,0	191,8	198,8	197,4
	130-70-30	158,5	152,5	151,3	171,6
	130-85-45	132,6	128,8	134,5	136,8
	130-100-60	122,1	124,3	121,0	121,0
	130-115-75	112,3	115,5	111,1	110,2
	130-130-90	99,0	103,0	98,0	96,0

*Controle: pó seco não aquecido

Os resultados na Tabela 1 e o gráfico da Figura 1 mostram claramente que a atividade das enzimas contida no pó de minhoca seco é suficientemente preservada após o aquecimento a 110°C (Exemplo 1) ou a 120°C (Exemplo 2), embora haja alguma perda. Em contraste, a atividade das enzimas contida no pó de minhoca seco é rapidamente perdida através

do aquecimento a 130°C (Exemplo Comparativo 1) como se torna óbvio ao comparar as atividades quando a temperatura de aquecimento alcança apenas 130°C (130-40-0) e aquelas mantidas a 130°C (130-55-15 e posterior).

5 Determinação da contagem celular

Conforme descrito acima, foi dissolvido 1g de cada um dentre os pós secos, sendo que cada um é termotratado a 120°C (Exemplos 2-1 a 2-5), a 80°C por 60 minutos (Exemplo Comparativo 2-1), a 90°C por 60 minutos (Exemplo Comparativo 2-2), e a 100°C por 60 minutos (Exemplo Comparativo 2-3) em 20 ml de água, para gerar uma solução de teste; a contagem celular viável geral da mesma foi determinada através do método de incubação de placa de ágar padrão; a contagem de bactérias coliformes foi determinada através do método do meio de substrato enzimático sintético; e a contagem de bactérias termofílicas através do Método descritos nos Métodos Padrão de Análise em Regulamento de Segurança de Alimentos (condição de aquecimento: ebulição, 10 minutos). Os resultados obtidos foram sumarizados na Tabela 2 seguinte.

Tabela 2

	Contagem celular viável geral (CFU/g)	Contagem de bactérias coliformes (CFU/g)	Contagem de bactérias termofílicas (CFU/g)
Controle*	94.000	Negativa (menor que 10)	3.500
120-70-30 (Exemplo 2-1)	440	Negativa (menor que 10)	10
120-85-45 (Exemplo 2-2)	400	Negativa (menor que 10)	Não detectada
120-100-60 (Exemplo 2-3)	220	Negativa (menor que 10)	Não detectada
120-115-75 (Exemplo 2-4)	160	Negativa (menor que 10)	Não detectada
120-130-90 (Exemplo 2-5)	50	Negativa (menor que 10)	10
80 °C (Exemplo Comparativo 2-1)	38.500	Negativa (menor que 10)	1.400
90 °C (Exemplo Comparativo 2-2)	18.800	Negativa (menor que 10)	1.100
100 °C (Exemplo Comparativo 2-3)	9.400	Negativa (menor que 10)	620

*Controle: pó seco não aquecido

Conforme se torna óbvio a partir dos resultados dos Exemplos

5 Comparativos 2-1 a 2-3 na Tabela 2, o ~~termotratamento a 80°C, 90°C ou 100°C~~ resultou na sobrevivência de muitas bactérias termofílicas e das células viáveis gerais, embora a *Escherichia coli* tenha sido esterilizada.

Em contraste, conforme se torna óbvio a partir dos resultados nos Exemplos 2-1 a 2-5, o termotratamento a 120°C induz a uma redução em todas as contagens de células viáveis gerais, *Escherichia coli* e bactéria termofílica a 1000 CFU/g, ou menos, o que demonstra a sua eficácia
5 suficiente em esterilização.

Os resultados nos Exemplos mostram claramente que os pós de minhoca secos produzidos através do método de produção, de acordo com a presente invenção, ~~retidos em uma atividade enzimática similar àquelas~~ observadas em pós de minhoca secos preparados através de métodos
10 convencionais e, em adição, foram suficientemente esterilizados.

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UM PÓ DE MINHOCA SECO

caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

triturar as minhocas vivas em um homogenato;

liofilizar o homogenato; e

tratar por aquecimento o produto seco a uma temperatura que se situa na faixa de 110°C ou mais elevada, porém mais baixa que 130°C.

2. MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UM PÓ DE MINHOCA SECO

de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a etapa de trituração é precedida por um processo para a preparação das minhocas vivas que compreende as etapas de:

manter as minhocas vivas sob luz por 10 a 50 horas;

remover a sujeira formada na pele das mesmas,

colocar as minhocas em contato com um ácido orgânico por 30 segundos ou menos;

diluir o ácido com a adição de água para ajustar o pH da solução ácida aquosa a um pH que se situa na faixa de 2 a 5;

manter a mistura de minhoca sob a condição de pH por 3 a 180 minutos; e, então,

lavar as minhocas com água.

3. MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UM PÓ DE MINHOCA SECO,

de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a etapa de trituração é precedida por um processo para a preparação das minhocas vivas que compreende as etapas de:

manter as minhocas vivas sob luz por 10 a 50 horas;

remover a sujeira formada na pele das mesmas,

imersão das minhocas em uma solução aquosa de um ácido orgânico dotado de um pH previamente ajustado que se situa na faixa de 2 a 5;

manter a mistura de minhoca sob a condição de pH por 3 a 180 minutos; e, então,

lavar as minhocas com água.

4. MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UM PÓ DE MINHOCA SECO,

de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a etapa de trituração é precedida por um processo para a preparação das minhocas vivas que compreende as etapas de:

manter as minhocas vivas sob luz por 10 a 50 horas;

remover a sujeira formada na pele das mesmas,

colocar as minhocas em contato com um pó de ácido hidroxicarboxílico cristalino por 30 segundos, ou menos;

diluir o ácido com a adição de água para ajustar o pH da solução ácida aquosa a um pH que se situa na faixa de 2 a 5;

manter a mistura de minhoca sob a condição de pH por 3 a 180 minutos; e, então,

lavar as minhocas com água.

5. MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UM PÓ DE MINHOCA SECO,

de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 4, caracterizado pelo fato de que a lavagem por água é executada com água que contém micro-nano bolhas.

6. MÉTODO DE PRODUÇÃO DE UM PÓ DE MINHOCA SECO,

de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que a liofilização é executada sob vácuo após o homogenato ser congelado a -18°C a -35°C por 20 a 240 horas.

