



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

(21) **PI0709874-0 A2**

(22) Data de Depósito: 05/04/2007
(43) Data da Publicação: 26/07/2011
(RPI 2116)



(51) Int.Cl.:

A23L 3/3508 2006.01
A61L 2/16 2006.01
A23L 3/3463 2006.01
A23L 3/3526 2006.01
A61K 31/195 2006.01
A61K 31/198 2006.01
A61K 35/74 2006.01
A61P 1/12 2006.01

(54) Título: **PREPARAÇÕES ANTIMICROBIANAS**

(30) Prioridade Unionista: 06/04/2006 EP 06 112286.7

(73) Titular(es): Purac Biochem B.V.

(72) Inventor(es): Aldana Mariel Ramirez, Roelf Otto

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007053407 de 05/04/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/113333 de 11/10/2007

(57) Resumo: PREPARAÇÕES ANTIMICROBIANAS presente invenção refere-se a um método para a conservação de alimentos contra bactérias Gram-negativas compreendendo a adição de uma preparação antimicrobiana contendo glicina e alanina aos alimentos. A invenção refere-se ainda ao uso de tais preparações antimicrobianas no controle da flora intestinal em seres humanos e animais.



PI0709874-0

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**PREPARAÇÕES ANTIMICROBIANAS**".

A presente invenção refere-se a uma preparação antimicrobiana e a um processo de conservação de alimentos. Em particular, a presente invenção refere-se a um processo de conservação de alimentos com a combinação de pelo menos dois aminoácidos. A invenção refere-se ainda ao uso de tais preparações no controle da flora intestinal em seres humanos e animais.

A morbidade e a mortalidade associadas ao consumo de alimentos contaminados por microorganismos infecciosos e que produzem toxinas não devem ser subestimadas. É por esta razão que a qualidade e a segurança microbiana dos alimentos é causa de constante preocupação para as indústrias alimentícias, consumidores e agências governamentais. Além disso, o apodrecimento e a putrefação de um alimento por microorganismos podem comprometer seu valor nutricional, podendo levar a perdas econômicas substanciais. O apodrecimento causado pelos micróbios resulta da proliferação descontrolada ou da atividade destes microorganismos. Para prevenir a ocorrência de tal fenômeno, tecnologias de conservação foram desenvolvidas a fim de garantir a qualidade e a segurança microbiológica dos alimentos. Tais tecnologias são diversas e incluem (i) procedimentos que previnem o acesso dos microorganismos aos alimentos; (ii) procedimentos que desativam os microorganismos; e (iii) procedimentos que previnem ou retardam o crescimento dos microorganismos. Alterações na demanda dos consumidores e na legislação que rege a produção de alimentos fazem com que os responsáveis pelas tecnologias alimentícias modifiquem e aperfeiçoem constantemente as tecnologias de processamento alimentício existentes, inventando e desenvolvendo novas tecnologias. A tendência agora é produzir alimentos que, não somente pareçam atraentes, frescos e mais naturais, mas que também combinem estas qualidades às conveniências cotidianas, tais como prazos de validade maiores e preparo mais fácil. Além disso, os consumidores também têm aumentado suas expectativas com relação ao sabor, textura, aparência e segurança. Assegurar a realização de tudo isto é

um grande desafio para os responsáveis pelas tecnologias alimentícias. No que diz respeito ao retardamento e à prevenção do crescimento de microorganismos nos alimentos, há uma série de novos pedidos para antimicrobianos químicos novos e mais naturais sendo registrados. Contudo, estes novos conservantes químicos devem satisfazer uma série de requerimentos: (i) devem possuir atividade bactericida ou bacteriostática eficaz contra uma ampla variedade de organismos de apodrecimento e patógenos alimentares diferentes; (ii) não devem afetar a aparência, o sabor, o aroma ou a textura dos alimentos; e (iii) não devem ser tóxicos para os consumidores. Sabe-se que certos aminoácidos apresentam propriedades bactericidas ou bacteriostáticas (por exemplo, Shive, W.; C.G. Skinner (1963) "Aminoacid analogues". Em: Metabolic inhibitors: A comprehensive treatise (Hochster, R.M.; J.H.Quastel eds). Academic Press. Nova Iorque. Volume 1, pp 1 – 73).

Além disso, muitos aminoácidos ocorrem naturalmente nos alimentos, sendo normalmente considerados seguros e adequados para utilização em produtos alimentícios. É exatamente por esta razão que alguns aminoácidos, em especial a glicina, têm sido utilizados comercialmente como conservantes.

Processos para conservação de produtos alimentícios com serina foram descritos nas patentes US 2.711.976 e US 6.602.532. Na patente US 3.615.703, o sabor dos produtos alimentícios ou bebidas contendo frutas ou sucos de fruta, vegetais ou sucos de vegetais, ou cerveja é conservado através da vedação hermética do alimento ou bebida em um receptáculo com lisina, ornitina, histidina ou sais dos mesmos. A patente GB 1.510.942 descreve um processo para a conservação de produtos alimentícios, particularmente daqueles contendo de 10-60% de açúcar, como por exemplo, gelatinas, geléias e pudins, que são protegidos contra a putrefação pela adição de maltose e glicina aos mesmos. A glicina está presente de forma apropriada em quantidades variando de 0,3 a 2%. Embora a glicina seja amplamente utilizada hoje em dia como conservante comercial, sabe-se que este composto não é um conservante poderoso, sendo necessárias grandes concentrações da mesma para que se obtenha a inibição desejada do crescimento

bacteriano. Tais concentrações elevadas, entretanto, geram uma nova categoria de problemas. Sabe-se que a glicina, a alanina, a serina e a treonina possuem, em diferentes graus, um sabor adocicado, enquanto a lisina e a ornitina ambas possuem sabores com notas doces e azedas, ao passo que a arginina é intensamente azeda. O impacto dos aminoácidos sobre o paladar limita a aplicação destes compostos na condição de conservantes alimentícios.

Para que a glicina seja utilizada de forma mais eficaz como conservante alimentar, criou-se a demanda por outras substâncias que possam ser utilizadas em conjunto com a mesma, aumentando seu efeito antimicrobiano. Lee et al. examinaram os efeitos antimicrobianos da utilização da glicina em combinação com o hexametáfosfato, EDTA, com o ácido cítrico e com o monocaprato de glicerol sobre uma série de espécies de bactérias Gram-positivas e negativas (Lee, J. K.; K. Tatsuguchi; M. Tsutsumi; T. Watanabe, J. Food Hig. Soc. Japan 26: 279-284 (1985)). Na WO 01/56408, 1,5-D-anidrofrutose foi usada em combinação com a alanina e com a glicina, a fim de se obter agentes conservantes de alimentos com substâncias antibacterianas altamente seguras que podem, desta forma, aumentar as qualidades de conservação dos alimentos sem produzir quaisquer efeitos indesejáveis sobre o paladar ou aroma dos alimentos.

Embora os processos descritos utilizem misturas antimicrobianas consistindo em um único aminoácido com um ou mais compostos não aminoácidos (veja acima), muito pouco se sabe a respeito das propriedades antimicrobianas das misturas de aminoácidos.

A presente JP 2000-224976 descreve um processo para a inibição de microorganismos, tal como a bactéria de ácido láctico *Enterococcus faecalis* em regiões com $\text{pH} \geq 6,5$ da comida, portanto, danificando pouco a qualidade do alimento usando uma mistura de lactato de cálcio e glicina e um sal de algum outro ácido orgânico. Embora tenha-se descrito na mesma patente que se pode substituir parte da glicina por alanina, os dados mostram que a alanina e as misturas de alanina e glicina são inibidores menos eficazes da proliferação das bactérias Gram-positivas *Enterococcus faecalis*

do que a glicina isoladamente. Demonstrou-se que a alanina não somente é capaz de contrapor o efeito inibitório da glicina no caso de bactérias Gram-positivas intimamente relacionadas a *Enterococcus hirae* e a *Lactococcus lactis*, mas também nas bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* (Snell, E.E.; B.M.Guirard (1943) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 29:66-73, Hishinuma, F.; K. Izaki; H. Takahashi (1969) "*Effects of glycine and the-amino acids on the growth of various microorganisms*" *Agr. Biol. Chem.* 33: 1577 – 1586). Bem se sabe que um aminoácido pode cancelar a inibição exercida por um outro aminoácido e este efeito foi observado em uma série de espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como por exemplo, nas bactérias Gram-positivas: *Bacillus anthracis* e *Listeria monocytogenes*; e nas espécies de bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* (Gladstone, G.P. (1939) Brit. J. Exp. Pathol. 20: 189-200; Friedman, M.E; W.G. Roessler (1961) *J. Bacteriol.* 82: 528-533; de Felice et al. (1979) *Microbiol.* ver 43:42-58).

Na patente US 2001/033884, uma preparação contendo glicina e serina é utilizada para a conservação de produtos alimentícios contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

O resumo da patente J-53050361 também descreve composições contendo glicina e serina para o ajuste do pH de alimentos.

As patentes US 2001/039264 e US 2002/144946 descrevem outras composições contendo pelo menos cinco ou mais aminoácidos para usos diversos, tais como para redução dos níveis sanguíneos de aminoácidos associados a prática severa de exercícios ou para redução da fadiga, e para a utilização em hemodiálise respectivamente.

Surpreendentemente, foi descoberto agora que a combinação de glicina e alanina produz um efeito sinérgico na inibição das bactérias Gram-negativas.

Por isso, a invenção refere-se a uma preparação antimicrobiana contendo pelo menos glicina e alanina dirigida contra bactérias Gram-negativas.

Desta forma, a presente preparação antimicrobiana contendo a

combinação de glicina e alanina é particularmente adequada para a inibição do crescimento de espécies de *Escherichia coli* O157:H7 e de *Salmonella*.

Bem se sabe que a combinação destes dois aminoácidos pode ainda ser combinada a um terceiro aminoácido. Verificou-se que estas combinações produzem efeitos antibacterianos maiores do que se esperaria com o uso isolado dos aminoácidos, isto é, mostrando um efeito sinérgico.

A alanina em questão é preferencialmente uma D-alanina. Mais preferencialmente, a preparação antimicrobiana contém uma DL-alanina. No caso de haver outros aminoácidos presentes na composição, estes são preferencialmente DL-aminoácidos.

Sob outro aspecto, a invenção refere-se a um método para a conservação de alimentos contra a ação de bactérias compreendendo a adição das preparações antimicrobianas contendo glicina e alanina acima mencionadas aos alimentos.

O método de acordo com a presente invenção é particularmente útil para a proteção de alimentos contra pelo menos um de *Salmonella entérica* e *Escherichia coli* O157:H7.

Exemplos de tais produtos alimentícios são produtos à base de carnes (curados ou não, frescos e/ou cozidos), saladas e outros produtos vegetais, bebidas e laticínios, alimentos semiprocessados, alimentos convenientes como, por exemplo, refeições prontas e produtos desidratados. O método é de particular interesse devido a alguns dos produtos frescos à base de carne serem utilizados para o consumo direto (como por exemplo, filet américain, steak tartar, sushi ou carpaccio) sem o prévio aquecimento ou com aquecimento prévio inadequado para garantir efeito bactericida. Outros produtos à base de carne são consumidos após a aplicação apenas de aquecimento parcial, aplicado de forma intencional como, por exemplo, para o preparo de carnes mal passadas, ou de forma não-intencional, aplicado devido à preparação inadequada ou por manuseio inadequado dos produtos alimentícios.

As preparações antimicrobianas da presente invenção, incluindo as preparações contendo glicina/alanina, podem ainda ser aplicadas em ou-

tras aplicações, tais como no controle da flora intestinal através da inibição da proliferação de bactérias Gram-negativas, tais como a *Salmonella* e a *Escherichia*, oferecendo uma vantagem seletiva às bactérias Gram-positivas, tais como os *Lactobacillus*, através da administração em conjunto com bactérias probióticas.

Utilizou-se em um estudo as seguintes culturas: serotipo *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 700728), *Salmonella enterica* (ATCC 13311). Todas as culturas foram transferidas diariamente em tubos com tampas de rosca (100 x 16 mm) contendo 10 ml de caldo de BHI ("*brain heart infusion*") (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). As culturas foram incubadas a 30°C sem agitar. O caldo BHI foi preparado com quantidades crescentes de dois aminoácidos. As faixas de concentração dos aminoácidos variaram de 0 a 450mM em etapas de 10 a 50mM. Isto resultou em 100 tipos de ensaios diferentes. O pH do meio foi ajustado para 6,1 - 6,2. Os meios foram preparados em quantidades de 10ml e subseqüentemente esterilizados por filtração (membranas de nitrato de celulose Sartorius com poros de 0,45 µm de diâmetro). Foram transferidos 300 µL de cada meio para placas "honeycomb" estéreis de 100 poços da Bioscreen. As placas de poços foram inoculadas com 5 µL de culturas cultivadas no caldo BHI ao longo de uma noite utilizando um dispensador de repetição Hamilton estéril de 5 µL (Hamilton, Bonaduz, Suíça). As taxas de crescimento foram determinadas através de testes Bioscreen C (LabSystems, Helsinki, Finlândia) que medem de forma cinética o desenvolvimento da turbidez através de fotometria vertical. As placas foram incubadas por 16-24 horas a 37°C, a densidade óptica das culturas foi medida a cada 30 minutos a 420-580nm usando um filtro de banda larga. O Bioscreen mede a densidade óptica das culturas em intervalos de tempo estipulados. A partir destes dados o Bioscreen calcula as taxas de crescimento específico máximas.

O propósito do processamento ulterior dos dados é ter certeza se os dois aminoácidos atuam de forma independente um do outro, de se estimulam um ao outro na sua ação inibitória (sinergia) ou se cancelam o efeito inibitório um do outro (antagonismo). Quando certo composto não a-

apresenta efeito sobre um organismo, a taxa de crescimento específico deste organismo (μ) pode ser expressa em função (f) da atividade inibitória do crescimento com dada concentração de substrato (s) através de, por exemplo, a equação Monod, a qual se escreve da seguinte maneira: $\mu = \mu_{\text{máx}} \cdot s / (K_s + s)$, em que $\mu_{\text{máx}}$ representa a taxa de crescimento específico máxima, s representa a concentração do substrato inibidor do crescimento no meio e K_s representa a concentração do substrato, em que $\mu = 0,5 \mu_{\text{máx}}$. Contudo, quando a presença de um certo inibidor afeta o crescimento celular, a função f para μ deve ser modificada, isto é, $\mu = f(s, p)$, em que p representa a concentração do inibidor p . Uma série de estudos sobre a inibição cinética da proliferação bacteriana tem demonstrado que muitos inibidores se comportam como inibidores não-competitivos. Isto implica que apenas o valor da taxa de crescimento específico máxima ($\mu_{\text{máx}}$), e não a afinidade (K_s) é afetada. Desta forma, a taxa de crescimento específico na presença do inibidor pode ser escrita da seguinte maneira: $\mu = \mu_i \cdot s / (K_s + s)$, em que μ_i é a taxa de crescimento específico máxima na presença de um inibidor p . A relação entre μ_i e $\mu_{\text{máx}}$ e entre a concentração do inibidor p pode ser descrita utilizando a equação de logística Dose-Resposta a qual se escreve: $\mu/\mu_{\text{máx}} = 1/(1 + [p/p_{0,5}]^b)$ (Jungbauer, A. (2001). "The logistic dose response function: a robust fitting function for transition phenomena in life sciences". J. Clinical Ligand Assay 24: 270 – 274). Nesta equação, p representa a concentração do inibidor P e $p_{0,5}$ representa a concentração de P quando $\mu_i = 0,5 \mu_{\text{máx}}$; $\mu_{\text{máx}}$ sendo a taxa de crescimento específico máxima, ou seja, a taxa de crescimento específico na ausência do inibidor P , b é uma quantidade não-mensurável que determina a relação entre μ_i e p . A combinação das equações de Monod com a equação de logística Dose-Resposta pode ser escrita da seguinte maneira: $\mu = \mu_{\text{máx}} (s/K_s + s) / (1 + [p/p_{0,5}]^b)$. Na cultura de batelada onde s comumente é muitas vezes maior que K_s esta equação se reduz a $\mu = \mu_{\text{máx}} / (1 + [p/p_{0,5}]^b)$.

Ao se comparar diferentes organismos proliferando-se sob condições similares, ou organismos similares proliferando-se sob condições distintas, é mais interessante que se utilize a taxa de crescimento relativo ao

invés da taxa de crescimento absoluto como padrão de comparação. A taxa de crescimento relativo (O) é a razão entre a taxa de crescimento (μ) e a taxa de crescimento máxima ($\mu_{\text{máx}}$), isto é, $O = \mu/\mu_{\text{máx}}$. Observa-se que enquanto μ e $\mu_{\text{máx}}$ apresentarem as unidades de dimensão $(\text{tempo})^{-1}$, a sua razão O não possuirá dimensão, ou seja, será um número puro. Pode-se definir de forma similar a concentração relativa do inibidor ε como $p/p_{0,5}$. A equação reduzida representativa da junção da equação de Monod e da equação de logística Dose-Resposta pode então ser escrita da seguinte maneira: $O = 1/(1 + \varepsilon^b)$. Para dois inibidores X e Y , por exemplo, é possível definir as duas expressões a seguir para O : $O_x = 1/(1 + \varepsilon^{b_1})$ e $O_y = 1/(1 + \varepsilon^{b_2})$.

O_x e O_y podem ser avaliados de forma experimental através de um exame dos efeitos inibitórios de X ou de Y sobre a taxa de crescimento do organismo em questão. Conhecendo as funções avaliadas para O_x e O_y , o efeito independente é definido em teoria da seguinte maneira: $O_x \cdot O_y$. O efeito observado de forma experimental para a combinação de X e Y sobre a taxa de crescimento relativo é definido como O_{xy} . A hipótese de que X e Y atuam de forma independente um do outro sobre certo organismo é matematicamente representada por $O_{xy}/O_x \cdot O_y = 1$. A rejeição desta hipótese implica que o efeito combinado de X e Y não é um efeito aditivo, mas sim sinérgico ou antagonístico. No caso, os inibidores X e Y atuam de forma sinérgica sobre o organismo em questão, $O_{xy}/O_x \cdot O_y < 1$, (porém > 0). Naqueles casos em que os efeitos combinados dos inibidores X e Y sejam antagonísticos $O_{xy}/O_x \cdot O_y > 1$. A sinergia, o efeito independente e o antagonismo podem ser visualizados em uma tabela comparando O_{xy} e $O_x \cdot O_y$.

Isto é exemplificado na figura 1, em que se oferece um gráfico da relação $O_{\text{Gly.Ala}}$ (taxa de crescimento relativo observada de forma experimental) em comparação com $O_{\text{Gly.OA}_{\text{la}}}$ (taxa de crescimento relativo prevista) para a *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 700728), mostrando a sinergia entre o efeito inibitório da glicina e DL-alanina. A linha contínua neste gráfico representa a linha onde se observou de forma experimental que a taxa de crescimento relativo ($O_{\text{gli.Oala}}$) se iguala a taxa de crescimento relativo prevista ($O_{\text{gli.ala}}$) e em que a glicina e a alanina atuam como inibidores indepen-

dentes.

A combinação entre a DL-alanina e a glicina é particularmente eficaz contra *Salmonella enterica* e *Escherichia coli* O157:H7 (sinergismo).

A competição entre *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 700728) e *Lactobacillus plantarum* (DFM 20174)(cultura mista A), e entre *Salmonella enterica* (ATCC 13311) e *Lactobacillus plantarum* (DFM 20174) (cultura mista B) foi estudada nas culturas de caldo. *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* e *Lactobacillus plantarum* foram transferidos diariamente para tubos com tampas de rosca (100 x 16 mm), contendo 10 ml de caldo de BHI (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). As culturas foram incubadas a 30°C sem serem agitadas. 500 µL de uma cultura de *Escherichia coli* cultivada por uma noite e 5 µL de uma cultura de *Lactobacillus plantarum* foram transferidos para tubos de tampa de rosca contendo 10ml de caldo BHI ou para tubos contendo 10 ml de caldo BHI com 200 mM de DL-alanina e 200 mM de glicina ou 400 mM de DL-alanina e 400 mM de glicina (cultura mista A, primeira transferência). 500 µL de culturas de *Salmonella entérica* e 5 µL de cultura de *Lactobacillus plantarum* cultivadas em uma noite foram transferidas para tubos de tampa de rosca contendo 10 ml de caldo de BHI preparado recentemente ou para um tubo contendo 10 ml de caldo de BHI preparado recentemente com 200 mM de DL-alanina e 200 mM de glicina ou com 400 mM de DL-alanina e 400 mM de glicina (cultura mista B, primeira transferência). Ambas as culturas mistas foram incubadas a 30°C. Após 24 horas, as culturas foram transferidas para um meio fresco (segunda transferência) e acondicionadas sobre ágar vermelho violeta bile lactose (VRBA) (Oxoid Basingstoke, CM 0485) e sobre ágar MRS (Oxoid, Basingstoke, CM0361). A segunda transferência também foi incubada por 24 horas a 30°C e acondicionada subsequenteiramente sob ágar vermelho violeta bile lactose (VRBA) e ágar MRS. Os resultados desta análise, os quais estão resumidos na tabela 1, demonstram a vantagem competitiva do *Lactobacillus plantarum* nas culturas mistas tanto com *Escherichia coli* quanto com *Salmonella enterica* em meios contendo DL-alanina e glicina.

Tabela 1. Unidades formadoras de colônia (cfu) por ml de caldo na primeira e na segunda transferência.

Aditivos no BHI	Cultura Mista A cfu/mL na primeira transferência		Cultura Mista BI cfu/mL na primeira transferência	
	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 700728	<i>Lb. plantarum</i> DSM 20174	<i>Salmonella</i> ATCC 13311	<i>Lb. plantarum</i> DSM 20174
nenhum	390. 10 ⁶	268. 10 ⁶	60. 10 ⁶	277. 10 ⁶
200 mM de glicina 200 mM de DL-alanina	25. 10 ⁶	264. 10 ⁶	15. 10 ⁶	660. 10 ⁶
400 mM de glicina 400 mM de DL-alanina	0	246. 10 ⁶	0	322. 10 ⁶

Aditivos no BHI	Cultura Mista A cfu/mL na segunda transferência		Cultura Mista B cfu/mL na segunda transferência	
	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 700728	<i>Lb. plantarum</i> DSM 20174	<i>Salmonella</i> ATCC 13311	<i>Lb. plantarum</i> DSM 20174
nenhum	291. 10 ⁶	630. 10 ⁶	40. 10 ⁶	780. 10 ⁶
200 mM de glicina 200 mM de DL-alanina	16. 10 ⁶	690. 10 ⁶	0	750. 10 ⁶
400 mM de glicina 400 mM de DL-alanina	0	610. 10 ⁶	0	940. 10 ⁶

A presente invenção foi utilizada para a conservação de alimentos. Os exemplos a seguir são ilustrativos da presente invenção. As culturas-
 5 estoque de *Salmonella typhimurium* ATCC 1331 e de *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 700728, que foram utilizadas para inocular as culturas líquidas foram rotineiramente mantidas em placas com ágar contendo a BHI (Oxoid CM225, Basingstoke, Reino Unido) reforçado com 1,5% de ágar. As culturas de *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* foram cultivadas em
 10 tubos com tampas de rosca (100 x 16ml) contendo 10 ml de caldo de BHI e incubadas ao longo de uma noite a 30°C. Pouco antes da inoculação dos alimentos, as culturas foram diluídas com uma solução contendo 0,1% de

peptona e 0,85% de NaCl.

Leite

Obteve-se leite desnatado estéril de um supermercado local. Quantidades apropriadas de aminoácidos foram adicionadas.

5 Massa (Lasanha)

Obteve-se uma lasanha bolonhesa pronta para comer de um supermercado local e o alimento foi completamente homogeneizado utilizando um liquidificador. Quantidades adequadas de aminoácidos foram adicionadas a 500g de lasanha homogeneizada. Esta mistura foi selada a vácuo e
10 subsequenteiramente irradiada (10 kGray). A lasanha irradiada foi armazenada a -30°C até a próxima utilização.

Carne Fresca

Bifes recém-cortados contendo aproximadamente 20% de gordura foram moídos utilizando um moedor de carne Primus MEW 613 (Maschinenfabrik Dornhan, Dornhan Alemanha) equipado com uma placa moedora de 2,541/20,32 cm (1/8" polegadas). A temperatura foi mantida a 10°C
15 durante todo procedimento. Quantidades apropriadas de aminoácidos foram adicionadas a 500g de carne moída. A mistura de carne moída com aminoácidos foi subsequenteiramente irradiada (10 kGray). A carne irradiada foi armazenada a -30°C até a próxima utilização.
20

Inoculação da Lasagna e da Carne Fresca:

Presunto de peru, lasanha ou carne fresca altamente congelados foram descongelados ao longo da noite a -4 ($\pm$ 1)°C. 500g dos produtos ainda congelados foram então rapidamente cortados em peças de 2-4cm e
25 transferidos para recipientes de um processador de alimento de cozinha (processador de alimento Tefal Kaleo tipo 67604). Adicionou-se 1,5 ml de uma cultura bacteriana diluída de forma adequada, misturando-se a composição resultante por aproximadamente de 30 a 60 segundos. Neste estágio, a temperatura da mistura ainda permanecia abaixo de 0°C. Após a mistura,
30 transferiu-se rapidamente duas porções em torno de 25 g da mesma mistura para sacos-filtros (Interscience, St Nom, França). Os produtos inoculados com *Escherichia coli* ou com *Salmonella typhimurium* foram incubados por

até duas semanas a 12°C.

Inoculação do Leite

O leite foi resfriado a 10°C e subseqüentemente inoculado com culturas de *Salmonella typhimurium* diluídas conforme apropriado. Amostras de leite inoculado foram incubadas a 12°C.

Análise microbiana

A análise microbiana das amostras dos alimentos foi realizada da seguinte maneira: abriu-se uma bolsa selante, adicionando-se a ela duas vezes o peso líquido de um fluido de diluição estéril (8,5% (p/v) NaCl e 0,1% (p/v) peptona bacteriológica). As amostras foram homogeneizadas por um minuto em uma batadeira de laboratório Stomacher 400 (Seward Medical, Londres, Inglaterra) e 50 µL da matéria homogeneizada foram acondicionados em um meio adequado de ágar utilizando um acondicionador espiral Eddyjet tipo 1.23 (IUL Instruments, Barcelona, Espanha). A *Escherichia coli* O157:H7 e a *Salmonella typhimurium* foram acondicionadas em ágar VRDBG (Oxoid, CM0485, Basingstoke, Reino Unido). As placas foram incubadas por 24 horas a 30°C então contadas.

Resultados

O efeito da adição isolada de glicina, DL-alanina e da mistura de glicina (0,67%) e de DL-alanina (0,8%) sobre o crescimento da *Salmonella typhimurium* no leite a 12°C é dado na tabela 1:

Dias	CFU/mL			
	0	2	4	6
controle	$5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^4$	$4 \cdot 10^5$	$9 \cdot 10^4$
0,67% de glicina	$5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^5$	$8 \cdot 10^4$
0,8% de alanina	$5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^4$	$4 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$
0,67% de Gly e 0,8% de Ala	$5 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^3$

A tabela mostra que, nas culturas de caldo, a glicina em concentração de 100mM e a DL-alanina em concentração de 100mM apresenta um pouco ou nenhum efeito sobre a taxa de crescimento da *Salmonella typhimurium*. A combinação por outro lado mostrou ser bastante eficaz na supressão do crescimento deste organismo no leite.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para a conservação de alimentos contra bactérias Gram-negativas compreendendo a adição de preparação antimicrobiana contendo glicina e alanina aos alimentos

5 2. Método de acordo com a reivindicação 1, no qual a preparação antimicrobiana contém DL-alanina.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, no qual o alimento é protegido contra pelo menos *Salmonella* ou *Escherichia coli*.

10 4. Método de acordo com a reivindicação 3, no qual o alimento é protegido contra pelo menos *Salmonella entérica*, *Escherichia coli* O157:H7.

5. Preparação antimicrobiana compreendendo dois ou três aminoácidos escolhidos dentre pelo menos glicina e alanina para a utilização no controle da flora intestinal de seres humanos ou animais.

15 6. Preparação antimicrobiana de acordo com a reivindicação 5, contendo bactérias probióticas e dois ou mais aminoácidos escolhidos dentre pelo menos glicina e alanina para a utilização no controle da flora intestinal de seres humanos ou animais.

20 7. Preparação antimicrobiana de acordo com a reivindicação 5 ou 6, para a utilização no controle da flora intestinal de seres humanos ou animais.

8. Método para o controle da flora intestinal de seres humanos ou animais através da administração de uma preparação antimicrobiana contendo pelo menos glicina e alanina.

25 9. Método de acordo com a reivindicação 8, no qual a preparação antimicrobiana é administrada contendo pelo menos glicina, alanina e uma bactéria probiótica.

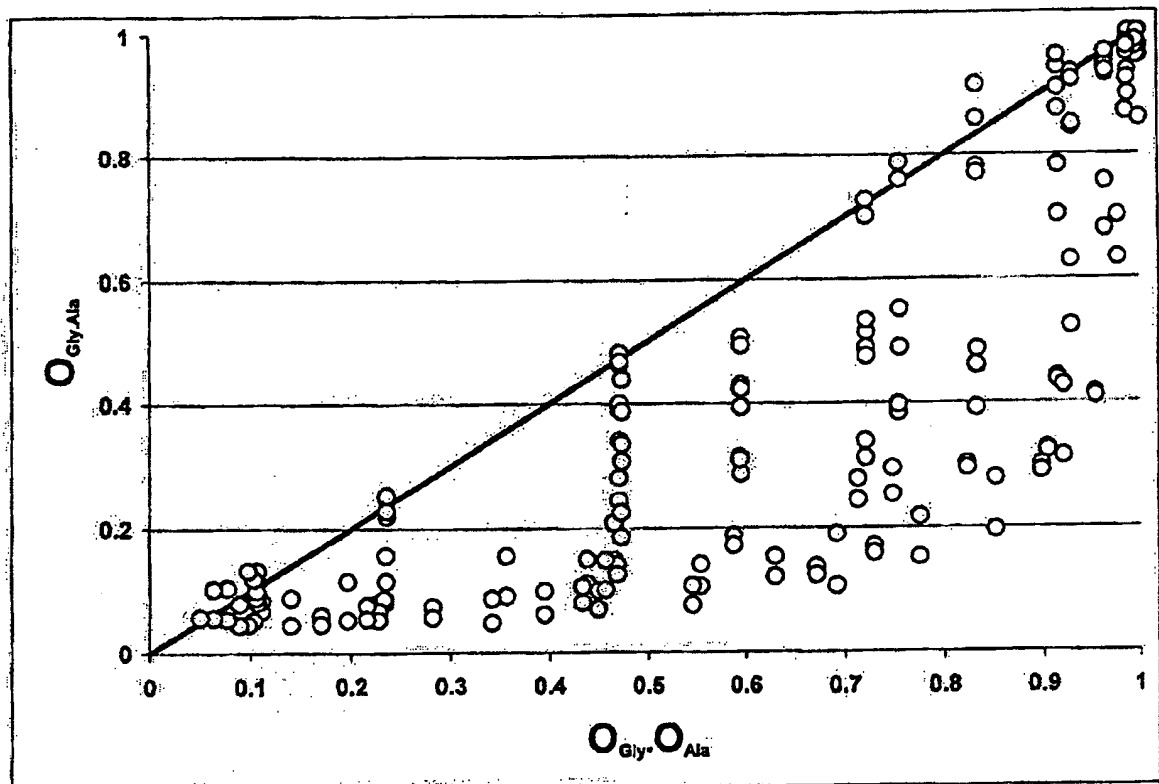


FIG. 1

RESUMO

Patente de Invenção: "**PREPARAÇÕES ANTIMICROBIANAS**".

5 A presente invenção refere-se a um método para a conservação de alimentos contra bactérias Gram-negativas compreendendo a adição de uma preparação antimicrobiana contendo glicina e alanina aos alimentos. A invenção refere-se ainda ao uso de tais preparações antimicrobianas no controle da flora intestinal em seres humanos e animais.