

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2005.01.26	(73) Titular(es): DANISCO A/S	
(30) Prioridade(s): 2004.01.28 US 765210	LANGBROGADE 1 1001 COPENHAGEN	DK
(43) Data de publicação do pedido: 2006.10.18	(72) Inventor(es):	
(45) Data e BPI da concessão: 2012.04.11 121/2012	GRAHAM WILLIAMS	GB
	JOSS DELVES-BROUGHTON	GB
	JOHN FARAGHER	US
	DIANE SALMELA	US
	JAY HARDY	US
	(74) Mandatário:	
	ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO	
	RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **PRODUTO DE PANIFICAÇÃO TRATADO COM NATAMICINA E SEU PROCESSO**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A UM PRODUTO DE PANIFICAÇÃO FINA LEVEDADO SEM LEVEDURA, COM ESTABILIDADE EM ARMAZENAMENTO AUMENTADA E A UM PROCESSO PARA AUMENTAR A ESTABILIDADE EM ARMAZENAMENTO DE PRODUTOS DE PANIFICAÇÃO FINA DE HUMIDADE INTERMÉDIA E ELEVADA. O PRODUTO DE PANIFICAÇÃO FINA COMPREENDE UM PRODUTO DE PANIFICAÇÃO DE HUMIDADE INTERMÉDIA OU ELEVADA QUE TEM UMA ACTIVIDADE DA ÁGUA $AW > 0,8$. A SUA SUPERFÍCIE TEM AÍ DEPOSITADA UMA QUANTIDADE EFICAZ DE NATAMICINA, A QUAL É SUFICIENTE PARA MANTER O PRODUTO SEM BOLORES QUANDO EMBALADO DURANTE UM TEMPO DE ARMAZENAMENTO DE 2 SEMANAS OU MAIS À TEMPERATURA AMBIENTE. NO PROCESSO, A SUPERFÍCIE EXTERNA DE UM PRODUTO DE PANIFICAÇÃO É PULVERIZADA COM NATAMICINA PARA AÍ DEPOSITAR UMA QUANTIDADE EFICAZ DE NATAMICINA, APÓS O QUE O PRODUTO PULVERIZADO É EMBALADO NUM ENVELOPE PROTECTOR.

RESUMO

"PRODUTO DE PANIFICAÇÃO TRATADO COM NATAMICINA E SEU PROCESSO"

A presente invenção refere-se a um produto de panificação fina levedado sem levedura, com estabilidade em armazenamento aumentada e a um processo para aumentar a estabilidade em armazenamento de produtos de panificação fina de humidade intermédia e elevada. O produto de panificação fina compreende um produto de panificação de humidade intermédia ou elevada que tem uma actividade da água $a_w > 0,8$. A sua superfície tem aí depositada uma quantidade eficaz de natamicina, a qual é suficiente para manter o produto sem bolores quando embalado durante um tempo de armazenamento de 2 semanas ou mais à temperatura ambiente. No processo, a superfície externa de um produto de panificação é pulverizada com natamicina para aí depositar uma quantidade eficaz de natamicina, após o que o produto pulverizado é embalado num envelope protector.

DESCRIÇÃO

"PRODUTO DE PANIFICAÇÃO TRATADO COM NATAMICINA E SEU PROCESSO"

Antecedentes da invenção

A presente invenção refere-se a um produto de panificação fina, levedado sem levedura, com estabilidade em armazenamento aumentada e a um processo para aumentar a estabilidade em armazenamento de produtos de panificação fina de humidade intermédia e elevada.

Muitos artigos de panificação produzidos industrialmente surgem do processo de panificação com uma superfície que está essencialmente estéril, mas a manipulação pós-cozedura pode conduzir, rapidamente, a contaminação superficial com fungos, como resultado da exposição a contaminantes transportados pelo ar, assim como por contacto com o equipamento. Após contaminação superficial, muitos artigos de panificação estão, depois, muito vulneráveis a deterioração superficial por bolores, cuja gravidade está ligada a factores, tais como grau de contaminação, teor de humidade do produto e as condições de armazenamento. Os produtos de panificação com um pH relativamente neutro, um teor elevado de humidade e uma elevada actividade da água, tais como bolos, queques, waffles e tortilhas são particularmente propensos a deterioração rápida a partir de uma variedade de bolores, principalmente espécies de *Penicillium* e *Aspergillus*. O fabrico de produtos saborosos com elevada humidade, com uma longa estabilidade em armazenamento

sem bolores, apresenta um desafio técnico constante e contínuo à indústria da panificação.

Vários métodos têm sido adoptados numa tentativa de atingir a requerida estabilidade em armazenamento. Estes incluem a adição de humectantes para reduzir a actividade da água, adição de conservantes químicos inibidores de bolores, tais como propionatos ou sorbatos, limitação da disponibilidade de oxigénio através de empacotamento com atmosfera modificada e empacotamento activo contendo captadores de oxigénio ou proporcionar o espaço livre da embalagem saturado com etanol, utilizando saquetas ou tiras no interior contendo etanol. Os conservantes químicos, tais como sorbato e propionato, são mais eficazes a pH baixo, pelo que são frequentemente adicionados ácidos em combinação com estes conservantes para reduzir o pH do produto de panificação e melhorar, assim, a eficácia do conservante adicionado.

A adição de ácidos, conservantes químicos e humectantes pode afectar sabor e a qualidade do produto e a sua utilização é frequentemente, um compromisso entre conseguir o produto com o melhor sabor e a mais longa possível estabilidade em armazenamento. A preservação baseada em sistemas de empacotamento confia muito na integridade da embalagem e mesmo os melhores sistemas podem sofrer falhas na estabilidade em armazenamento devido a deterioração da embalagem ou falhas de selagem e, assim, perda de integridade da embalagem. Desta forma, permanece o problema técnico de proporcionar um sistema eficiente de conservação que não afecte de forma adversa o sabor de artigos de panificação.

A natamicina é um agente antifúngico natural poliénico macrólido, produzido por fermentação da bactéria *Streptomyces*

natalensis. A natamicina (previamente conhecida como pimaricina) tem um modo de acção extremamente eficaz e selectivo contra um espectro muito vasto de leveduras e bolores de deterioração alimentar comuns, sendo a maioria das estirpes inibidas por concentrações de 1-15 ppm de natamicina.

A natamicina tem sido utilizada há muitos anos num grande número de países, em todo o mundo, como um tratamento de conservação autorizado para queijos e determinados produtos de carne, tal como enchidos secos. Apesar desta utilização a longo prazo, o desenvolvimento de estirpes resistentes não foi descrito até ao presente, ao contrário dos conservantes químicos de ácido orgânico sorbato e propionato, para os quais foi detectada e descrita uma variedade de leveduras e bolores resistentes. Algumas espécies de bolor de *Penicillium* são mesmo capazes de degradar e metabolizar o sorbato.

A natamicina é muito menos solúvel em água do que os conservantes químicos de ácido orgânico, sendo a sua solubilidade máxima de cerca de 40 ppm. Na prática, isto significa que, quando aplicada à superfície do queijo ou enchido, a natamicina apresenta uma difusão muito limitada e tende a permanecer na superfície do alimento. A natamicina é activa ao longo de uma vasta gama de pH e, ao contrário dos conservantes do ácido orgânico, não está dependente de um ambiente ácido a baixo pH para mostrar uma boa actividade antifúngica. A eficácia da natamicina a níveis de aplicação muito baixos em queijo e enchidos não foi descrita como tendo qualquer impacto adverso na qualidade ou sabor dos produtos.

Embora a natamicina tenha sido utilizada há muito tempo em queijo e enchidos, existe muito pouca informação sobre a utilização da natamicina para outros tipos de alimentos. De

acordo com um artigo de revisão "Antibiotics in Food: Primarcin" na *Encyclopaedia of Food Technology* Volume 2. 1974, The Avi Publishing Co. Inc. Westport, Connecticut, EUA, p 36-37, Eds. A.H. Johnson e M.S. Peters, a natamicina (pimaricina) é permitida em diversos países como um aditivo alimentar e é adicionada ao alimento (e. g., sumo de laranja, vinho) ou o alimento é mergulhado, embebido ou pulverizado com natamicina aquosa (e. g., queijo, enchido, fruta).

O documento US 2004/0013781 divulga um pão totalmente cozido que permanece mole durante um período prolongado de armazenamento. O pão pode ser protegido por um inibidor microbiano que pode ser natamicina. Nas formas de realização descritas, o inibidor é incluído na massa do pão durante a panificação. Contudo, existe também uma sugestão de que um inibidor de sorbato de potássio, numa solução aquosa, poderia ser pulverizado sobre o pão após cozedura.

Nos EUA é permitida a adição directa de natamicina em massa de tortilha antes da cozedura. A massa de tortilha é levedada sem levedura e, deste modo, é possível a adição de natamicina na massa de tortilha. Em massas levedadas com levedura, a natamicina não pode ser utilizada uma vez que a natamicina mata a levedura. Por causa desta limitação da utilização de natamicina em panificação com levedura, a natamicina parece ter sido testada na superfície de pão levedado com levedura. Assim, o artigo de revisão na Enciclopédia de 1974 mencionado acima, também refere que "pão branco e de centeio foram bem protegidos quando as suas superfícies foram pulverizadas com uma solução de 100-500 ppm de pimaricina". Nenhum resultado específico é citado para apoiar o comentário "bem protegidos" e nenhuma referência é citada para este trabalho. Não são apresentados níveis alvo para a natamicina/pimaricina à superfície do pão, não são mencionados

métodos de pulverização nem estabilidade em armazenamento alvo. Numa actualização posterior deste artigo de revisão para a mesma enciclopédia, não foi mencionado este trabalho de panificação. O artigo de revisão faz também referências vagas semelhantes ao tratamento superficial de massas de pão não cozido e à adição directa a 25-50 ppm em recheios para bolos e empadas.

A adição directa de natamicina em coberturas e recheios de bolos é também descrita por J. Tichá em *Mlynsko-pekařensky promysl*, 7/1975, p 225-228, como sendo eficaz para prevenir o crescimento de bolores e leveduras durante cerca de 14 dias. Este artigo conclui que a natamicina misturada com lactose é útil para conservar recheios de coalhada, coberturas e cremes de manteiga.

A utilização de natamicina para proteger a superfície dos recheios de pastéis e *mooncakes* de Cantão é permitida de acordo com a legislação Chinesa. Contudo, os próprios *mooncakes* têm, frequentemente, uma actividade da água razoavelmente baixa e não são, deste modo, tão propensos a deterioração como os recheios, que são frequentemente feitos de produtos alimentares facilmente perecíveis.

É requerido que muitos produtos de panificação fina tenham uma estabilidade em armazenamento muito longa. Os produtos de panificação fina de humidade intermédia e elevada, tais como queques, tortilhas, waffles, panquecas, pizzas, pastéis, pães-de-ló e semelhantes, são geralmente empacotados e mantidos a temperaturas ambiente em armazenamento durante 2 a 10 semanas e, por vezes, mais tempo. Pelo contrário, os artigos de panificação levedados com levedura, tal como pão, tendem a ficar bafientos/duros num período muito mais curto e a estabilidade em

armazenamento da maioria do pão é normalmente não superior a duas semanas.

O elevado teor de água de muitos produtos de panificação fina torna-os muito sensíveis a deterioração devido ao crescimento de bolores e leveduras. Isto é especialmente verdade quando a actividade da água do produto a_w é 0,8 ou mais, especialmente 0,85 ou mais. Numa tentativa de proteger artigos de panificação com humidade intermédia e humidade elevada do crescimento de bolores, a presente requerente adicionou natamicina à massa de tortilha, como permitido pelas regulamentações U.S., e à massa de pastéis e cobertura lustrosa de ovo de *mooncakes* Chineses antes da cozedura. Contudo, surpreendentemente, as tentativas falharam e não resultaram em nenhuma melhoria significativa da estabilidade em armazenamento dos artigos de panificação. Verificou-se que a incorporação de natamicina no interior do produto de panificação foi mal sucedida, apesar do facto dos níveis de natamicina, que seriam normalmente considerados eficazes contra leveduras e bolores, podiam ainda ser detectados nos artigos após o processo de panificação.

Em dois ensaios separados em que foi incorporada natamicina (como Natamax) em tortilhas, não foi conseguido o controlo do crescimento superficial de bolores durante o armazenamento. A análise das tortilhas bolorentas de ambos os ensaios mostrou que a natamicina estava ainda presente dentro das tortilhas em níveis entre 14,0 e 28,0 ppm. Esperava-se, normalmente, que estes níveis relativamente elevados de natamicina residual apresentassem um bom controlo do crescimento de bolores, indicando que a natamicina presente dentro destas tortilhas não estava biologicamente disponível à superfície do produto, onde era requerido para ser eficaz.

Consequentemente, a natamicina não poderia ser utilizada nos produtos de panificação levedados sem levedura, do modo que um especialista normalmente e, de um modo preferido, a aplicaria, *i. e.*, por adição directa da natamicina aos ingredientes antes da cozedura. Permaneceu, assim, o problema de como aumentar a estabilidade em armazenamento dos produtos de panificação fina que têm uma elevada actividade da água e uma tendência para crescimento de bolores, ao mesmo tempo que se optimizam as características desejáveis do produto, tais como pH e sabor.

Os documentos citados neste texto ("documentos aqui citados"), assim como cada documento ou referência citada em cada um dos documentos aqui citados e todas as regulamentações, literatura de fabricantes, descrições, instruções, fichas técnicas dos produtos, fichas técnicas dos materiais e semelhantes, relativamente a cada produto mencionado neste texto, são aqui expressamente incorporados por referência.

Breve sumário da invenção

A presente invenção é baseada na verificação de que a natamicina pode ainda ajudar a superar problemas de conservação de artigos de panificação fina de humidade intermédia e elevada, desde que seja aplicada à superfície dos produtos de panificação após cozedura. O teor de humidade relativamente elevada nos produtos de panificação comprova que uma quantidade eficaz de natamicina dissolvida estará continuamente presente para combater o crescimento de leveduras e bolores na superfície dos produtos de panificação.

Assim, a presente invenção proporciona um produto de panificação, levedado sem levedura, de humidade intermédia ou elevada, que tem uma actividade da água $a_w > 0,8$, tendo a superfície do referido produto de panificação depositada sobre si uma quantidade eficaz de natamicina que é suficiente para manter o referido produto sem bolores, quando empacotado durante um período de armazenamento de 2 semanas ou mais à temperatura ambiente, em que a referida quantidade eficaz de natamicina compreende desde 1 a 10 μg por cm^2 da superfície do referido produto de panificação.

A presente invenção também proporciona um processo para aumentar a estabilidade em armazenamento de produtos de panificação fina, compreendendo proporcionar um produto de panificação fina cozido que tem uma actividade da água $a_w > 0,8$; pulverizar a superfície externa do referido produto de panificação com natamicina para aí depositar uma quantidade eficaz de natamicina; empacotar o referido produto de panificação pulverizado num envelope protector; e armazenar o referido produto empacotado à temperatura ambiente. A natamicina depositada na superfície do referido produto de panificação é proporcionada numa quantidade que é eficaz para manter o referido produto sem bolores, mesmo quando armazenado durante 3 semanas ou mais, em que a referida quantidade eficaz de natamicina compreende desde 1 a 10 μg por cm^2 da superfície do referido produto de panificação.

O produto de panificação fina da invenção é um produto de panificação fina levedado sem levedura que tem uma actividade da água $a_w > 0,8$, de um modo preferido, entre 0,8 e 0,95, de um modo preferido, entre 0,80 e 0,90, de um modo muito preferido, entre 0,85 e 0,90. Os produtos de panificação fina de longa estabilidade em armazenamento preferidos, protegidos pela

invenção, são seleccionados de queques, waffles, tortilhas, pizzas, bases de pizza, panquecas, pastéis, pães-de-ló e produtos cozidos de panificação fina semelhantes. A expressão panificação fina deve ser considerada como incluindo também produtos de panificação fina parcialmente cozidos.

O aumento da estabilidade em armazenamento sem bolores conseguido através da presente invenção tem muito significado para a indústria de panificação e permitirá a substituição de conservantes químicos, tais como propionato, benzoato e sorbato, com natamicina, uma alternativa menos tóxica, sem sabor e natural. A convicção que a natamicina não é um conservante eficaz para artigos de panificação (com base em evidências de falta de eficácia quando incorporada no alimento antes da cozedura), foi demonstrada que é falsa e foi superada pela presente invenção através de pulverização de natamicina sobre produtos após cozedura. Embora isto requeira que potenciais utilizadores invistam em equipamento de pulverização adequado que possa distribuir uma aplicação uniforme de natamicina a todas as superfícies de produtos de panificação, as vantagens da natamicina são vistas como compensando as desvantagens da sua utilização.

Sem se pretender estar limitado por qualquer teoria, acredita-se que a falta de eficácia da natamicina, notada quando a natamicina foi incluída directamente nos ingredientes dos produtos de panificação fina, foi causada por uma combinação de 1) degradação pelo calor da natamicina superficial e 2) formação de uma crosta superficial durante a panificação que impediu a natamicina no interior do artigo cozido de alcançar a superfície.

Descrição detalhada da invenção

A falta de eficácia que foi observada quando a natamicina foi incorporada em produtos de panificação levedados sem levedura com elevada actividade da água, antes da cozedura, conduziu à ideia para a nova solução alternativa de aplicar a natamicina, como uma suspensão baseada em água, precisamente pulverizada directamente nas superfícies expostas do produto de panificação fina de elevada actividade da água após o processo de cozedura. Esta nova abordagem direcciona uma concentração suficiente de natamicina disponível, directamente na superfície do produto de panificação onde ocorre contaminação com fungos. Quaisquer problemas de perdas durante o processo de panificação e de disponibilidade na superfície foram superados.

Consequentemente, a invenção proporciona um produto de panificação fina, cuja estabilidade em armazenamento foi aumentada pela utilização de natamicina na sua superfície. Os produtos de panificação fina são produtos levedados sem levedura, pretendidos para uma longa estabilidade em armazenamento e que têm um teor de humidade que os torna susceptíveis a deterioração superficial por bolores e leveduras. Tais produtos de panificação fina são produtos de panificação de humidade intermédia ou elevada que têm uma actividade da água $a_w > 0,8$, de um modo preferido, 0,85 ou mais. Um teor de humidade de 0,8 a 0,85 é aqui considerado como um teor de humidade intermédio, enquanto um teor de humidade acima de 0,85 é considerado como um teor de humidade elevado. Os exemplos típicos de tais produtos de panificação fina são bolos, queques, waffles, tortilhas, pizzas, panquecas, pastéis, pães-de-ló e produtos de panificação de elevada actividade da água, assim como produtos de panificação fina parcialmente cozidos

semelhantes. As pizzas são, por exemplo, pizzas prontas a comer ou bases de pizza.

A superfície do produto de panificação fina da invenção tem depositada sobre si uma quantidade eficaz de natamicina que é suficiente para manter o produto sem crescimento de bolores e leveduras, embora o produto esteja empacotado e armazenado durante um período de 2 semanas ou mais. A quantidade eficaz de natamicina na superfície do produto terminado está entre 1 - 10 μg por cm^2 e é suficiente para manter o produto panificado sem bolores durante 3 a 10 semanas, de um modo preferido, durante 6 a 10 semanas ou ainda mais tempo, quando o produto é armazenado à temperatura ambiente, o que varia geralmente entre 15 e 30 °C e que, mais frequentemente, é desde 18 a 25 °C.

Quando o processo da presente invenção é realizado, a superfície externa de um produto de panificação fina cozido que tem uma actividade da água $a_w > 0,8$ é pulverizado com natamicina. A pulverização deve ser realizada de modo que uma quantidade eficaz, em termos de conservação, de natamicina seja depositada na superfície exposta do produto. Tipicamente, a natamicina é pulverizada sobre a superfície exposta na forma de uma suspensão aquosa contendo natamicina, como natamicina dissolvida e também em forma não dissolvida sólida, cristalina. A natamicina cristalina é pouco solúvel em água e os cristais de natamicina sólida finamente divididos serão depositados na superfície conjuntamente com água e a natamicina dissolvida. Uma suspensão aquosa de natamicina preferida para fins de pulverização contém natamicina numa concentração de 250 a 7000 mg, de um modo mais preferido, 1000 a 4000 mg de natamicina por litro de água.

Numa forma de realização preferida da invenção, a natamicina é depositada na referida superfície numa suspensão que inclui um

espessante. O espessante é seleccionado, de um modo preferido, do grupo consistindo de ágar, alginatos, carragenina, celulose e derivados, gomas, gelatina, pectinas e os seus derivados, acetato de polivinilo, amidos e amidos modificados e agentes de suspensão. Os derivados de celulose úteis são aqueles como celulose microcristalina de sódio, hidroxipropilmetilcelulose, carboximetilcelulose e metilcelulose. As gomas utilizadas são, e. g., goma de xantana, goma de gelano, goma de alfarroba, goma-arábica, goma de tragacanto, goma de caraia, goma de guár, goma rhamxam, goma conjac e goma de semente. Os agentes de suspensão utilizados são, e. g., dodecilsulfato de sódio, polietilenoglicol, sílica pirogenada, glicol e glicerol.

O espessante na suspensão assegura que a natamicina pulverizada permanece distribuída uniformemente no ponto de deposição e não se agrupa de forma não homogénea nas fendas dos artigos de panificação.

Uma quantidade muito pequena de natamicina é requerida para proporcionar a protecção desejada contra deterioração por bolores e leveduras. Verificou-se que uma quantidade depositada de natamicina desde 1 a 10 μg por cm^2 da superfície do produto de panificação compreende a uma quantidade eficaz.

A natamicina deve ser pulverizada de forma homogénea em todas as superfícies externas do produto de panificação de modo a proteger todo o produto. A natamicina tem uma tendência muito baixa para migração no produto e não se irá espalhar muito para além do ponto de deposição. De modo a proporcionar uma deposição homogénea, o equipamento de pulverização deve ser seleccionado com cuidado. A suspensão de pulverização baseada em natamicina é distribuída, de um modo preferido, através de um disco rotativo, um pulverizador de funcionamento pneumático ou qualquer outro

sistema de pulverização adequado que for capaz de distribuir um pequeno, mas consistente e exacto, volume, sobre uma determinada área superficial. O volume da suspensão de natamicina de base aquosa, pulverizada sobre o produto deve, de um modo preferido, ser mantido ao nível mínimo que permitirá uma cobertura superficial uniforme.

A natamicina depositada na superfície do produto de panificação deve, contudo, ser eficaz em manter o produto de panificação sem bolores, mesmo quando armazenado durante 2 semanas ou mais.

Após pulverização, o produto de panificação é empacotado num envelope protector que é feito, de um modo preferido, de um material transparente, tais como uma película ou caixa plástica, para permitir que o presumível comprador veja o produto e seja tentado pelo mesmo. As películas são, geralmente, de um material à prova de humidade para evitar que o produto de panificação húmido seque e perda a sua macieza, durante diversas semanas de armazenamento.

Os seguintes exemplos ilustram a invenção.

Exemplo de Referência Natamicina em *mooncakes*

Os *mooncakes* são produtos de panificação tradicionais que são panificados e comidos em grandes números, uma vez por ano na China, para comemorar um festival no Outono. Os bolos consistem de uma camada externa fina de massa que cobre uma variedade de recheios de tipo de pasta que são moldados em formas complexas antes da cozedura. A parte externa do bolo é coberta com um revestimento lustroso de ovo e parte é cozinhada a 200 °C-210 °C

durante 15 minutos, antes de um segundo revestimento lustroso de ovo ser aplicado, pronto para a cozedura final de 10 minutos à mesma temperatura. A produção em grande escala, venda e armazenamento de *mooncakes* começam no período anterior ao festival e podem ocorrer problemas com bolores à superfície destes produtos antes de serem consumidos.

Dois ensaios de produção de *mooncakes* contendo pasta de feijão de lótus foram realizados para testar a eficácia da adição directa de natamicina antes da cozedura, para preservar estes produtos de panificação. Os bolos foram embalados em sacos de plástico transparentes individuais sem qualquer outro conservante.

Para a primeira produção, uma gama de quatro níveis crescentes de natamicina (20, 25, 30 e 35 ppm) foi misturada na massa crua em quatro pequenos lotes separados, antes de lustrar e cozer. Para a segunda produção, nada foi adicionado à massa, mas uma gama crescente dos mesmos quatro níveis de natamicina de 20-35 ppm foi adicionada ao revestimento de ovo que foi aplicado à superfície do bolo após a primeira cozedura, mas antes da segunda e final fase de cozedura. Foram também preparados bolos de controlo sem qualquer adição de natamicina.

Amostras representativas de cada lote foram ensaiadas quanto à natamicina residual em amostras de 10 g da camada superficial dos bolos. Foram detectados bons níveis de actividade residual de natamicina na superfície dos bolos em todas as amostras para ambas as produções, mas apesar disto o crescimento de bolores de deterioração apareceu, mesmo assim, na superfície de todos os bolos tratados com natamicina no intervalo de 20-24 dias do fabrico.

Exemplo 1 Natamicina na superfície de produtos de panificação fina

Os queques são artigos de panificação fina, levedados sem levedura e baseados em farinha, propensos a deterioração superficial devido ao crescimento de bolores e leveduras. A sua actividade da água a_w é, tipicamente, cerca de 0,85.

Os queques foram preparados de acordo com uma receita padrão sem a adição de conservantes na massa. Logo após a cozedura, os queques individuais foram pulverizados, enquanto estavam ainda mornos, com uma escolha de quatro diferentes tratamentos de pulverização:

- 1 - apenas água (controlo).
- 2 - água contendo 8% de sal adicionado.
- 3 - água contendo 4 g por litro de lactose Natamax[™] (contendo 50% de natamicina) obtida de Danisco A/S.
- 4 - água contendo 8 g por litro de lactose Natamax[™].

A pulverização foi realizada utilizando um pulverizador pneumático manual com reservatório integral. O reservatório foi agitado regularmente durante a pulverização para assegurar que os pequenos cristais não dissolvidos de natamicina permaneciam em suspensão. Cada queque foi pulverizado uniformemente sobre todas as superfícies, com um volume mínimo de pulverização ajustado de forma fina.

Após arrefecimento, os queques pulverizados foram embalados em sacos transparentes de polietileno termosselados com 8 a 10 queques por tratamento por saco. As amostras iniciais foram seleccionadas e testadas para actividade da água, pH e concentração superficial de natamicina. Os sacos fechados de

queques foram armazenados para avaliação da estabilidade em armazenamento a 25 °C e examinados diariamente para sinais de bolor superficial ou crescimento de leveduras.

A determinação da natamicina superficial foi realizada como se segue: A área superficial dos queques foi calculada como sendo 150 cm². Os queques individuais foram raspados e o material superficial total adicionado a 100 mL de metanol de elevada pureza e agitado durante 1 hora. Foram adicionados 50 mL de água de elevada pureza e a solução foi depois filtrada através de um filtro membrana de 0,2 µm. O teor de natamicina foi determinado por análise de HPLC para toda a superfície e, depois, dividido por 150 para produzir um resultado em µg de natamicina por cm² de superfície do queque.

Os resultados da análise das amostras iniciais são mostrados na Tabela 1. Como esperado, o nível mais elevado de natamicina residual foi detectado nos queques pulverizados com a concentração mais elevada de suspensão Natamax™ (tratamento 4).

Tabela 1: Resultados da análise inicial

Tratamento	Natamicina residual µg/cm ²	Actividade da Água (Aw)	pH
1) apenas água	< 1	0,839	9,39
2) 8% de sal	< 1	0,854	9,45
3) 4 g/L de Natamax™	2,7	0,864	9,18
4) 8 g/L de Natamax™	4,5	0,851	9,25

Os resultados do estudo de incubação das embalagens de queques a 25 °C são apresentados na tabela 2. As embalagens de

queques de controlo pulverizados apenas com água ou com 8% de sal em água foram considerados como deteriorados após apenas 5 e 11 dias, respectivamente, devido ao crescimento de bolores superficiais claramente visíveis. Pelo contrário, verificou-se que todas as embalagens de queques pulverizados com os dois níveis de tratamento da suspensão Natamax™ estavam completamente livres de qualquer crescimento superficial de bolores durante um período total de incubação de 70 dias, após o qual a incubação foi parada.

Tabela 2: Resultados após incubação a 25 °C

Tratamento	Número de dias em incubação a 25 °C	Deterioração devido ao crescimento de bolores
1) apenas água	5 dias	Todos deteriorados
2) 8% de sal	11 dias	Todos deteriorados
3) 4 g/L de Natamax™	70 dias	Nenhum deteriorado
4) 8 g/L de Natamax™	70 dias	Nenhum deteriorado

No fim do período de incubação de 70 dias, as amostras em triplicado dos queques não deteriorados, dos tratamentos 3 e 4 de pulverização com Natamax™, foram ensaiados para níveis superficiais de natamicina, actividade da água (A_w) e pH. Os resultados destas análises finais são apresentados na Tabela 3. A natamicina residual era ainda detectável a níveis semelhantes àqueles da amostra inicial para o tratamento 4 de pulverização de concentração mais elevada e a níveis reduzidos para o tratamento 3 de pulverização de concentração mais baixa.

Tabela 3: Resultados da análise final

Tratamento	Natamicina residual $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Aw (fora do queque)	pH (fora do queque)	Aw (dentro do queque)	pH (dentro do queque)
3) 4 g/L de Natamax™	0,7	0,85	6,97	0,85	8,15
	0,7	NT	NT	NT	NT
	0,7	NT	NT	NT	NT
4) 8 g/L de Natamax™	4,2	0,83	6,21	0,84	7,91
	3,6	NT	NT	NT	NT
	4,8	NT	NT	NT	NT
NT = não testado					

Os resultados acima demonstram claramente a excelente eficácia conservante da natamicina, quando pulverizada na superfície deste produto de panificação com base em farinha de humidade relativamente elevada, na prevenção ou retardamento de deterioração devido ao crescimento superficial de levedura e bolores

Exemplo 2 Natamicina na superfície de produtos de panificação fina

Foram preparados queques de acordo com a mesma receita padrão como no Exemplo 1. Os queques individuais foram submetidos a um dos três tratamentos, com um mínimo de 50 queques por tratamento

1 - Sem pulverização (controlo)

2 - Pulverização apenas com água (controlo)

3 - Água contendo 4,2 g por litro de Natamax™ SF (sem açúcar, contendo 87% de natamicina) obtida de Danisco A/S.

Os queques foram pulverizados logo após terem sido cozidos, enquanto estavam ainda mornos. A pulverização foi feita com um pulverizador pneumático manual com reservatório integral. O reservatório foi agitado regularmente durante a pulverização, para assegurar que os pequenos cristais não dissolvidos de natamicina permaneciam em suspensão. O volume mínimo aproximado de pulverização requerido para cobrir uniformemente toda a superfície de um queque foi medido e uma concentração de 4,2 g por litro de Natamax™ SF foi calculada para atingir uma distribuição de pulverização de 5 µg de natamicina por cm² de queque no tratamento 3. Cada queque foi pulverizado uniformemente sobre todas as superfícies.

Após arrefecer, os queques pulverizados foram embalados em sacos transparentes de polietileno termoselados individuais. Uma amostra foi seleccionada de cada um dos dois tratamentos de controlo e cinco amostras do tratamento de pulverização de Natamax™ SF e testada para a actividade da água, pH, contagem de leveduras e bolores a 25 °C e níveis residuais de natamicina superficial por análise de HPLC. Quarenta queques fechados por tratamento foram armazenados para avaliação da estabilidade em armazenamento a 25 °C e examinados diariamente para sinais de bolor superficial ou crescimento de leveduras.

Os resultados da análise das amostras iniciais são apresentados na Tabela 4. Verificou-se que os níveis residuais de natamicina detectados nos queques pulverizados com a suspensão Natamax™ SF eram próximos do nível alvo de 5 µg por cm².

Tabela 4: Resultados da análise inicial

Tratamento	Natamicina residual µg/cm ²	Actividade da água (fora do queque)	Actividade da água (dentro do queque)	Bolores a 25 °C/g	pH
1) Sem pulverização (controlo)	< 0,2	0,855	0,867	< 50	8,55
2) Apenas água (controlo)	< 0,2	0,863	0,877	< 50	8,65
3) 4,2 g/L de Natamax™ SF	5,1	0,863	0,879	< 50	8,27
	4,3	NT	NT	< 50	NT
	3,4	NT	NT	< 50	NT
	3,8	NT	NT	< 50	NT
	5,8	NT	NT	< 50	NT
NT = Não testado					

Os resultados do estudo de incubação dos 40 queques por tratamento são apresentados na Tabela 5. A primeira amostra de controlo sem pulverização (tratamento 1) desenvolveu crescimento superficial de bolor após apenas 7 dias, proporcionando uma estabilidade em armazenamento sem bolor de apenas 6 dias. A amostra de controlo pulverizada com a primeira água (tratamento 2) desenvolveu crescimento superficial de bolor após apenas 10 dias. Pelo contrário, todos os 40 queques pulverizados com suspensão de Natamax™ SF permaneceram completamente livres de qualquer crescimento superficial de bolor durante um período total de incubação de 68 dias, após o que a incubação foi

parada. Assim, neste ensaio, um tratamento de pulverização superficial de natamicina de aproximadamente 5 µg/cm² aumentou a estabilidade em armazenamento sem bolores dos queques a 25 °C de 6 dias para, pelo menos, 68 dias.

Tabela 5: Resultados após incubação a 25 °C

Dias incubados a 25 °C	Número mostrando crescimento de bolor/ Número sob incubação		
	Tratamento 1 controle sem pulverização	Tratamento 2 Controle apenas com água	Tratamento 3 4,2 g/L de Natamax™ SF
6	0/40	0/40	0/40
7	1/40	0/40	0/40
9	2/40	0/40	0/40
10	3/40	1/40	0/40
14	5/40	1/40	0/40
17	6/40	2/40	0/40
23	6/40	3/40	0/40
24	7/40	4/40	0/40
63	8/40	4/40	0/40
68	8/40	4/40	0/40

Exemplo 3 Suspensão de natamicina na superfície de queques

A suspensão de natamicina como tal, assim como a suspensão de natamicina contendo um espessante, foram testadas na superfície de queques. A suspensão de natamicina continha 2000 ppm de natamicina ou 2000 ppm de natamicina e 0,25% de espessante HPMC, respectivamente.

Os queques foram preparados de acordo com uma receita padrão sem qualquer conservante adicionado na massa. Logo após a cozedura, um terço dos queques foi pulverizado, enquanto ainda estavam mornos, com a suspensão de natamicina sem um espessante e um terço com a suspensão de natamicina incluindo o espessante. A pulverização foi realizada utilizando um pulverizador pneumático manual com reservatório integral. Cada queque foi pulverizado uniformemente sobre todas as superfícies com um volume mínimo de pulverização ajustado de forma fina.

Após arrefecimento, os queques pulverizados foram embalados em sacos transparentes de polietileno termosselados. Os sacos fechados de queques foram armazenados para avaliação da estabilidade em armazenamento a 25 °C e examinados diariamente para sinais de bolor superficial ou crescimento de leveduras.

As amostras de queques tratados com natamicina, assim como as amostras de queques não tratados de controlo (que não tinham qualquer natamicina pulverizada sobre a superfície) foram armazenadas à temperatura ambiente (25 °C). As amostras tratadas com natamicina não mostraram qualquer bolor após 16 dias de armazenamento, enquanto as amostras de controlo apresentaram

crescimento muito rápido de bolores - após 5 dias, como pode ser verificado na Tabela 6 abaixo, de observação de bolores.

Tabela 6

Dias até observação de bolor	Queque não tratado/ controlo	Queque tratado com natamicina	Queque tratado com natamicina + espessante
1	0	0	0
2	0	0	0
5	0	0	0
6	1	0	0
7	2	0	0
8	3	0	0
9	4	0	0
10	4	0	0
11	4	0	0
12	4	0	0
13	5	0	0
14	5	0	0
15	5	0	0
16	5	0	0
Escala: 0 = nenhum bolor observado 5 = deterioração extensa com bolor			

A Tabela mostra de forma bastante clara que o tratamento com uma suspensão de natamicina com ou sem um espessante, previne o crescimento de bolores no queque.

Os exemplos acima demonstram, claramente, a eficácia conservante da natamicina quando pulverizada na superfície externa de produtos de panificação fina que têm uma actividade da água acima de 0,8, os quais que são susceptíveis a deterioração superficial por bolores e leveduras durante o armazenamento.

Lisboa, 18 de Junho de 2012

REIVINDICAÇÕES

1. Produto de panificação fina levedado sem levedura, com estabilidade em armazenamento aumentada compreendendo um produto de panificação de humidade intermédia ou elevada que tem uma actividade da água $a_w > 0,8$, tendo a superfície do referido produto de panificação aí depositada uma quantidade eficaz de natamicina que é suficiente para manter o referido produto sem bolores, quando embalado durante um tempo de armazenamento de 2 semanas ou mais à temperatura ambiente, em que a referida quantidade eficaz de natamicina compreende desde 1 a 10 μg por cm^2 da superfície do referido produto de panificação.
2. Produto de panificação fina da reivindicação 1, em que o referido produto de panificação fina é seleccionado de queques, waffles, tortilhas, pães-de-ló, pizzas, pastéis, panquecas e semelhantes, produtos cozidos ou parcialmente cozidos.
3. Produto de panificação fina da reivindicação 1, em que a actividade da água a_w do referido produto de panificação está entre 0,8 e 0,95.
4. Produto de panificação fina da reivindicação 3, em que a actividade da água a_w do referido produto de panificação está entre 0,8 e 0,90.
5. Produto de panificação fina da reivindicação 3, em que a actividade da água a_w do referido produto de panificação está entre 0,85 e 0,90.

6. Produto de panificação fina da reivindicação 1, em que a referida natamicina é depositada na referida superfície numa suspensão que inclui um espessante seleccionado do grupo consistindo de ágar, alginatos, carragenina, celulose e derivados, gomas, gelatina, pectinas e seus derivados, acetato de polivinilo, amidos e amidos modificados e agentes de suspensão.
7. Produto de panificação fina da reivindicação 1, em que a referida natamicina é depositada na referida superfície numa quantidade desde 1 a 10 μg por cm^2 para manter o referido produto de panificação sem bolores durante um tempo de armazenamento de 3 a 10 semanas.
8. Produto de panificação fina da reivindicação 7, em que a referida natamicina é depositada na referida superfície numa quantidade desde 1 a 10 μg por cm^2 para manter o referido produto de panificação sem bolores durante um tempo de armazenamento de 6 a 10 semanas.
9. Produto de panificação fina da reivindicação 1, em que a referida temperatura ambiente compreende uma temperatura de 15 a 30 °C.
10. Produto de panificação fina da reivindicação 9, em que a referida temperatura ambiente é desde 18 a 25 °C.
11. Produto de panificação fina da reivindicação 1, em que o referido produto é embalado num envelope protector.
12. Produto de panificação fina da reivindicação 11, em que o referido envelope é um material à prova de humidade e/ou transparente.

13. Processo para aumentar a estabilidade em armazenamento de produtos de panificação fina, compreendendo
- proporcionar um produto de panificação fina cozido que tem uma actividade da água $a_w > 0,8$;
 - pulverizar a superfície externa do referido produto de panificação com natamicina para aí depositar uma quantidade eficaz de natamicina;
 - embalar o referido produto de panificação pulverizado num envelope protector; e
 - armazenar o referido produto embalado à temperatura ambiente;
 - sendo a natamicina depositada na superfície do referido produto de panificação eficaz na manutenção do referido produto sem bolores, mesmo quando armazenado durante 3 semanas ou mais, em que a referida quantidade eficaz de natamicina compreende desde 1 a 10 μg por cm^2 da superfície do referido produto de panificação.
14. Processo da reivindicação 13, em que a referida natamicina é pulverizada na referida superfície na forma de uma suspensão aquosa.
15. Processo da reivindicação 14, em que a referida suspensão inclui um espessante seleccionado do grupo consistindo de ágar, alginatos, carragenina, celulose e derivados, gomas, gelatina, pectinas e seus derivados, acetato de polivinilo, amidos e amidos modificados e agentes de suspensão.
16. Processo da reivindicação 14, em que a referida suspensão contém natamicina numa concentração de 250 a 7000 mg de natamicina por litro de água.

17. Processo da reivindicação 16, em que a referida suspensão contém natamicina numa concentração de 1000 a 4000 mg de natamicina por litro de água.
18. Processo da reivindicação 14, em que a referida suspensão de natamicina contém natamicina dissolvida e natamicina cristalina.
19. Processo da reivindicação 13, em que a referida natamicina é pulverizada homogeneamente em todas as superfícies externas do referido produto de panificação.

Lisboa, 18 de Junho de 2012