



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 285 747**

51 Int. Cl.:
A23L 3/3463 (2006.01)
C12P 19/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Número de solicitud europea: **98200780 .9**
86 Fecha de presentación : **11.03.1998**
87 Número de publicación de la solicitud: **0865738**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **23.09.1998**

54 Título: **Complejo soluble de natamicina-proteína.**

30 Prioridad: **14.03.1997 EP 97200764**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

73 Titular/es: **DSM IP Assets B.V.**
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL

72 Inventor/es:
Van Rijn, Ferdinand Theodorus Joseph;
Stark, Jacobus y
Geijp, Edith Magda Lucia

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

ES 2 285 747 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 285 747 T3

DESCRIPCIÓN

Complejo soluble de natamicina-proteína.

5 La presente invención se relaciona con la preparación de composiciones que comprenden natamicina y el uso de tales composiciones para tratar alimentos tales como quesos y embutidos o productos agrícolas tal como frutas, granos y semillas. Además son descritos dichos productos tratados con composiciones de la invención.

Por más de 20 años la natamicina ha sido usada para prevenir el crecimiento de hongos en quesos y embutidos.

10 Los quesos son tratados por inmersión en una suspensión de natamicina en agua o cubiertos con una emulsión de un polímero en agua, principalmente acetato de polivinilo. Los embutidos son mayormente tratados por inmersión o por recubrimiento mediante rociado con una suspensión de natamicina en agua. Usualmente las suspensiones acuosas para tratamientos de inmersión contienen de 0.1% a 0.2% % p/v de natamicina mientras que las emulsiones de polímero para propósitos de recubrimiento contienen de 0.01% a 0.05% p/v de natamicina.

Estos tratamientos pueden ser altamente efectivos para prevenir el crecimiento de hongos en la superficie de los quesos y embutidos. Sin embargo debido a la baja solubilidad de la natamicina, especies de moho que son menos susceptibles a la natamicina algunas veces no son completamente inhibidas. Así, alguna degradación por hongos puede aún ocurrir. Ejemplos de especies de hongos que son más tolerantes hacia la natamicina son las especies *Verticillium cinnabarinum*, *Botrytis cinerea* y *Trichophyton*. Especies más tolerantes pueden ser también encontradas entre aquellas del tipo *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Un ejemplo de tales especies las cuales algunas veces provocan problemas de moho en la industria del queso es el *Penicillium discolor*.

25 Debido a la baja solubilidad de la natamicina un producto alimenticio tratado con este antimicótico será protegido contra el crecimiento de hongos por un período más largo. Solamente la natamicina que está en solución estará disponible para ejercer actividad anti-fúngica.

30 La natamicina tiene una MIC (Concentración Inhibitoria Mínima) de menos de 10 ppm para la mayoría de los hongos que crecen en los alimentos, mientras que la solubilidad en agua es desde 30 a 50 ppm (Brik, H.; "Natamicina" Analytical profiles of Drug Substances 10, 513- 561, (1981). Después de muchos años de uso continuo de este antimicótico no han sido nunca encontrados hongos resistentes a la natamicina (De Boer, E.; Stolk-Horsthuis, M.; "Sensitivity to natamicina (pimaricin) of fungi isolated in queso warehouses" J. of Food Prot. 40, 533-536, (1977)). Bajo condiciones normales la natamicina protegerá los productos alimenticios tales como el queso completamente contra la degradación por hongos durante un corto período de tiempo.

35 Sin embargo, algunas veces la cantidad de hongos presente en los alrededores es alta, por ejemplo en una fábrica de queso, de manera que la fracción disuelta de natamicina es insuficiente para prevenir el crecimiento de hongos en el queso, o las condiciones de producción o de almacenamiento en las fábricas son particularmente favorables para el crecimiento de hongos. Un ejemplo de un factor importante que intensifica el crecimiento de hongos es el control insuficiente de la humedad relativa.

En tales casos las especies de moho más tolerantes crecerán en los productos tratados con natamicina.

45 La degradación por mohos puede provocar pérdidas económicas considerables y un sistema anti-fúngico más eficiente es necesario para proteger productos alimenticios tal como el queso contra la degradación por más especies de moho tolerantes a la natamicina.

50 EP0466038 describe complejos anti-fúngicos de polietileno disperso en agua y el proceso para la preparación del mismo.

El complejo de anfotericina B de desoxicolato tiene posibles efectos colaterales tóxicos, el más serio siendo la nefrotoxicidad. Estos efectos colaterales tóxicos pueden estar relacionados con la pobre solubilidad en agua. Los complejos descritos ofrecen la ventaja de liberar rápidamente el agente anti-fúngico en el agua sin reducir su actividad.

55 La presente invención se relaciona con un proceso que apunta a mejorar la actividad de la natamicina hacia los hongos y con composiciones preparadas de acuerdo a dicho proceso. En particular tales composiciones pueden ser útiles para combatir hongos y levaduras los cuales son normalmente relativamente menos sensibles a la acción de la natamicina.

60 En el caso de hongos con relativamente baja susceptibilidad a la natamicina la solubilidad y difusión puede tener un efecto más limitante en su actividad anti-fúngica. Cuando una preparación fungicida convencional que contiene natamicina es empleada, en estado de equilibrio la cantidad promedio de natamicina disuelta puede caer por debajo de la concentración efectiva debido a que la eliminación no será adecuadamente compensada por disolución y difusión de los compuestos anti-fúngicos.

65 La modificación de la forma polimórfica de los compuestos anti-fúngicos de polieno, tal como la natamicina, también puede conducir a una actividad mejorada de estos compuestos hacia especies menos susceptibles (Solicitud

de Patente Europea No. 670676, (1995)). Ejemplos de tales formas modificadas son los solvatos de natamicina, tales como el solvato de metanol y modificaciones del cristal de natamicina. La actividad de los fungicidas de polieno puede ser también intensificada convirtiendo el compuesto en una sal de metal alcalino térreo, tal como las sales de bario y de calcio.

5

Otro método para intensificar la actividad de los fungicidas de polieno es disolver primero el compuesto anti-fúngico en un solvente y luego incorporar el fungicida disuelto en una composición acuosa (Solicitud Europea No. 670676). Ejemplos de sistemas de solventes apropiados son los alcoholes inferiores tal como el metanol, el etanol y el propanol; el glicerol y glicol; el metoxi etanol y el etoxi etanol; el ácido acético glacial y las soluciones ácidas y alcalinas acuosas; además pueden ser usados solubilizadores apropiados.

10

Estos antibióticos de polieno modificados pueden ser también aplicados sobre un portador por métodos bien conocidos; por ejemplo, por técnicas de recubrimiento por rociado usando una solución de la composición anti-fúngica sobre un portador o evaporando el solvente de una mezcla de una solución del anti-fungicida y el portador.

15

La solución del compuesto anti-fúngico puede ser incorporada en la composición final adicionando la solución a una preparación o vice versa.

La intensificación de la actividad podría ser lograda mejorando la disponibilidad del compuesto anti-fúngico como un resultado de la disolución mejorada (EP 670676). La solubilidad en agua puede ser incrementada usando condiciones alcalinas o ácidas. La solubilidad puede también ser intensificada usando solventes. Sin embargo es bien conocido que la natamicina disuelta es rápidamente descompuesta bajo tales condiciones (Brik, ver arriba). Adicionalmente es conocido que la natamicina disuelta es menos estable comparada con la forma cristal. La natamicina por ejemplo puede ser desactivada por descomposición a través de la acción de la luz o por hidrólisis.

20

Puede ser concluido que todos los métodos conocidos para intensificar la actividad de los fungicidas de polieno por intensificación de la disponibilidad conducen a una rápida descomposición del fungicida de polieno.

25

Inesperadamente fue encontrado que la actividad de la natamicina hacia los hongos y levaduras puede ser marcadamente intensificada si la natamicina es acomplejada con un compuesto apropiado.

30

Además fue encontrado que los complejos descritos en este documento son muy estables bajo condiciones acuosas, por ejemplo, recubrimiento de queso o una solución de inmersión/rociado.

La presente invención proporciona un complejo, que comprende natamicina acomplejada a una o más proteínas o amino ácidos, que cuando está presente en agua, no produce cristales visibles usando un microscopio que tiene una magnitud de 400x.

35

Ventajosamente este complejo substancialmente no pierde actividad dentro de 60 días. En general, la proporción de natamicina con relación a la cantidad total de proteína o amino ácido es 10,000:1 a 1:10, preferiblemente esta proporción es 100:1 a 1:1.

40

Preferiblemente al menos una de las proteínas es una proteína de la leche, más preferiblemente una proteína del suero de la leche, caseína o caseinato.

45

El complejo puede ser producido por el siguiente método:

(1) disolver la natamicina en un líquido acuoso aumentando o reduciendo el pH, tal como usando métodos bien conocidos;

50

(2) mezclar la natamicina (disuelta) con el compuesto apropiado (o agente acomplejante);

(3) adherir la natamicina a un compuesto apropiado ajustando el pH a un nivel requerido usando métodos bien conocidos; y opcionalmente

55

(4) aislar el complejo de natamicina adherido al compuesto apropiado de la fracción líquida usando métodos conocidos.

El complejo puede también ser producido usando el siguiente método:

60

(1) disolver la natamicina en un sistema solvente apropiado;

(2) adherir la natamicina a un compuesto apropiado mezclando la natamicina disuelta con ese compuesto; y

(3) opcionalmente aislar el complejo de natamicina adherido al compuesto apropiado de la fracción líquida usando métodos conocidos *per se*. Este compuesto puede ser presentado en una solución acuosa o suspensión.

65

ES 2 285 747 T3

El complejo de natamicina adherido al compuesto apropiado puede ser usado para diferentes aplicaciones que incluyen prevenir la infección y el crecimiento de hongos en los productos naturales siendo productos alimenticios o productos agrícolas.

5 Antes de la aplicación el complejo formado y opcionalmente purificado puede también ser mezclado con sistemas acuosos, tales como agua o recubrimiento para queso, o con otros compuestos apropiados. En vez de aislar el complejo es también posible usar el complejo en la composición acuosa o en el sistema solvente directamente, por ejemplo en la aplicación de recubrimiento de queso.

10 Se piensa que la actividad intensificada de una composición de la presente invención sea debida a la disponibilidad mejorada del compuesto anti-fungicida como resultado de la disolución mejorada.

Usualmente sólo la natamicina que está en solución estará disponible para ejercer actividad anti-fungicida. En el caso de un fungicida con una baja solubilidad uno de los factores que influencia el efecto fungicida es la disolución del fungicida. Otros factores importantes son la difusión del fungicida disuelto por la parte de la contaminación y la eliminación del fungicida disuelto. La natamicina por ejemplo puede ser inactivada por descomposición a través de la acción de la luz o por hidrólisis (Daamen, C.B.G. y Berg, G. van den; "Prevención del crecimiento de moho en quesos por medio de natamicina" Voedingsmiddelentechnologie, 18 (2), 26-29, (1985)).

20 La natamicina tiene una Concentración Inhibitoria Mínima (MIC) de menos de 10 ppm para la mayoría de los hongos que crecen en los alimentos. Como se mencionó anteriormente la solubilidad de la natamicina en agua es desde 30 a 50 ppm, lo cual es en la mayoría de los casos suficiente para prevenir el crecimiento de hongos durante un corto período de tiempo. La eliminación de la natamicina disuelta es generalmente compensada suficientemente en estas situaciones por disolución de la natamicina no disuelta y por difusión de la natamicina disuelta al sitio de infección.

En la presente invención es descrito un complejo de natamicina adherido al compuesto apropiado. Además son descritos los métodos para producir estos complejos.

30 Un método para producir el complejo de natamicina adherido a un compuesto apropiado es disolver la natamicina aumentando o reduciendo el pH usando métodos conocidos en el arte. Preferiblemente el pH está por encima de 10 o por debajo de 4. Ejemplos de ácidos acuosos apropiados son las soluciones acuosas de HCl, H₂SO₄, ácido cítrico y ácido láctico. Ejemplos de soluciones alcalinas apropiadas son las soluciones de hidróxidos tales como NaOH, KOH y NH₄OH.

35 La natamicina disuelta es mezclada con el compuesto apropiado, preferiblemente una proteína o amino ácido. Preferiblemente es usada una proteína de grado alimenticio. Ejemplos de proteínas apropiadas son las proteínas de la leche, por ejemplo las proteínas del suero de la leche, caseínas o caseinatos u otros compuestos, tal como la L-glutamina. Además mezclas de diferentes proteínas y mezclas de proteínas con otros compuestos tales como grasas por ejemplo grasas vegetales y animales y aceites tales como la grasa de la leche, grasa de manteca, aceite de fríjol de soya y aceite de girasol pueden ser usados. También composiciones o productos que contienen (mezclas de) estos compuestos pueden ser usados.

45 Ejemplos de tales mezclas son la leche de vaca o la leche del fríjol de soya. Después de mezclar la natamicina disuelta con el compuesto apropiado, el pH es ajustado entre 5 y 9, preferiblemente entre 6 y 8. Cuando el compuesto apropiado no está presente, la natamicina cristalizará. Ha sido sorprendentemente encontrado que la presencia del compuesto apropiado puede prevenir la formación de los cristales visibles cuando se usa un microscopio que tiene una magnitud de 400 x. Se piensa que la natamicina y el compuesto (por ejemplo leche, proteínas) forman un complejo el cual no es visible usando el microscopio a esta ampliación. Posiblemente este complejo es formado en la superficie de la proteína. Se ha notado que a una alta proporción natamicina/proteína parte de la natamicina no siempre formó el complejo pero en cambio podía formar cristales.

Otro método para producir un complejo de natamicina y el compuesto apropiado es disolver la natamicina en un sistema solvente apropiado.

55 Los sistemas solvente apropiados son los alcoholes inferiores tal como metanol, etanol, propanol, etileno glicol, propileno glicol y glicerol y mezclas de los mismos. Además, en un solvente alcohólico apropiado, uno o más grupos hidroxilo pueden estar unidos por un enlace éster al ácido graso o unido a otro grupo alcohol por un enlace éter. Ejemplos de tales solventes son metoxi etanol y etoxi etanol.

60 Además los solubilizadores tales como surfactantes pueden ser adicionados al solvente. Ejemplos de solubilizadores apropiados son el lauril sulfato de sodio, dioctil sulfosuccinato, cloruro de calcio o surfactantes de tipo no-iónico, por ejemplo aquellos que son vendidos bajo las marcas comerciales Tween, Span, Brij y Myrj.

65 La formación del complejo o adhesión entre la natamicina y la proteína apropiada, puede ser logrado adicionando la proteína a la solución o vice versa. La proteína puede ya estar presente en un ambiente acuoso tal como agua o leche.

ES 2 285 747 T3

El complejo de natamicina y una o más proteínas pueden ser usadas directamente en la aplicación deseada o pueden ser procesadas posteriormente. Por ejemplo el complejo puede ser aislado y/o purificado usando métodos bien conocidos. Ejemplos de métodos de secado para separar el complejo de un líquido son la filtración, centrifugación, evaporación de ese líquido, secado rociado, secado por congelación y secado en lecho fluidizado.

5

Además bajo condiciones acuosas, por ejemplo en un recubrimiento para queso, el complejo puede ser almacenado por un largo período por ejemplo al menos medio año sin que pierda actividad sustancial.

El complejo purificado de natamicina y una o más proteínas es usado para el tratamiento de productos naturales siendo productos alimenticios o productos agrícolas.

Además el complejo purificado de natamicina y una o más proteínas en el sistema acuoso o en el sistema solvente es usado para el tratamiento de dichos productos naturales.

Las composiciones que comprenden un complejo de la invención pueden ser usadas para el tratamiento de productos alimenticios y productos agrícolas de acuerdo a los métodos de tratamiento conocidos *per se*, por ejemplo inmersión o rociado.

La composición anti-fungicida de la invención puede ser usada para el tratamiento de productos alimenticios o productos agrícolas. Particularmente preferido para el uso en tratamientos son las emulsiones preparadas a partir de las emulsiones de recubrimiento comúnmente empleadas en la industria alimenticia. Por ejemplo para el tratamiento de quesos una emulsión de polímero acuosa del tipo acetato de polivinilo, que puede ser usada aplicándola con brocha o con un dispositivo de rociado, puede ser usada. Una composición de la invención puede también estar en forma de una emulsión (por ejemplo para recubrimiento) del tipo aceite-en-agua o agua-en-aceite. Ejemplos de preparaciones apropiadas para tratar los productos agrícolas tales como las frutas son películas de materiales poliméricos tales como por ejemplo poliolefinas, por ejemplo polietileno y polipropileno.

La cantidad de natamicina en una composición líquida para tratamiento por inmersión o rociado puede ser desde 0.01% a 2% p/v. Preferiblemente la cantidad es desde 0.01 a 1% p/v. En principio el líquido de inmersión puede ser de cualquier tipo. Cuando un sistema acuoso es usado, la adición de un surfactante puede ser ventajosa, en particular para tratar objetos con una superficie hidrofóbica. Surfactantes útiles son por ejemplo los tensioactivos aniónicos tal como lauril sulfato de sodio o ésteres de alquilo polietileno tales como Cetomacrogol® 1000 o éteres de polioxietileno por ejemplo Tween® 60, 61 y 65.

En una emulsión de recubrimiento de acuerdo a la invención, la cantidad de natamicina puede ser desde 0.005% a 2% p/v, preferiblemente desde 0.01% a 1% p/v y más preferiblemente desde 0.01% a 0.5% p/v.

Leyenda de las figuras

* La Figura 1 da la zona de inhibición (en mm) del *Penicillium discolor* como función del tiempo (días).

* La Figura 2 muestra la cantidad promedio de colonias/cuba como una función del tiempo.

La invención será ahora descrita a modo de ejemplo con referencia a los Ejemplos acompañantes.

45

Ejemplo 1

Este ejemplo describe un método microbiológico para determinar la disponibilidad de un componente anti-fungicida de la composición anti-fungicida.

50

Los discos de papel de filtro (S&S Discos de Prueba de Antibióticos no. 321260 con un diámetro de 0.6 cm fueron cargados con la preparación a ser probada. Cada disco fue cargado con 250 µg de natamicina es decir 50 µg de una muestra conteniendo 5000 ppm de natamicina fue aplicada a un disco. Los discos fueron entonces colocados en agar el cual fue sembrado con *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 e incubados a 30°C durante 24 horas. Como referencia, los discos fueron frescamente cargados con un rango de cantidades conocidas de natamicina disuelta en metanol acuoso.

55

Al día siguiente, los discos de muestra fueron transferidos a nuevos discos petri conteniendo agar sembrado con *Saccharomyces cerevisiae*. Los nuevos discos frescamente cargados con un rango de cantidades conocidas de natamicina disuelta fueron preparados para su uso como referencia. Los nuevos discos con los discos de muestra y las nuevas referencias fueron incubados a 30°C durante 24 horas.

60

El tamaño de la zona de inhibición es una medida de la natamicina liberada del disco de muestra. La cantidad de natamicina liberada puede ser entonces calculada por métodos conocidos.

65

Repetiendo el procedimiento, la natamicina liberada puede ser medida en base diaria.

ES 2 285 747 T3

Ejemplo 2

Este ejemplo describe la preparación de los complejos de natamicina.

5 1. 0.5 gramos de natamicina fueron disueltos en 80 ml de agua aumentando el pH a 11.5 usando NaOH (4N)

2. Compuestos apropiados para acomplejar con natamicina fueron:

- 10 - Caseinato de sodio (MIPRODAN® 30, MD food) 3.3% (p/p) disuelto en agua desmineralizada (A)
- proteína del suero de la leche (ESPIRION 580, DMV Veghel) 6.6% (p/p) disuelto en agua desmineralizada (B)
- Grasa de manteca (Corman)
- aceite de fríjol de soya (Cargill)
- 15 - aceite de girasol (Cargill)
- bebida de soya (Provamel) (C)
- leche esterilizada (Campina) (D)

20 Además fueron preparadas emulsiones (500 ml) mezclando los siguientes compuestos (acomplejantes) e incubados durante 5 minutos en una máquina Ultra turax T50 (Janke & Kunkel) a 8000 - 9500 revoluciones por minuto:

- 25 - agua desmineralizada 96.0%, grasa de manteca (Corman) 4% (E)
- agua desmineralizada 92.7% (p/p), 3.3% Caseinato de sodio (p/p), grasa de manteca 4.0% (p/p) (F)
- agua desmineralizada 92.7%, Caseinato de sodio 3.3%, aceite de fríjol de soya 4% (G)
- agua desmineralizada 89.4%, proteína del suero de la leche 6.6%, grasa de manteca 4.0% (H)
- 30 - agua desmineralizada 89.4%, proteína del suero de la leche 6.6%, aceite de girasol 4.0% (I)

35 3. 5.0 ml del Caseinato de sodio disuelto, proteína del suero de la leche disuelta, bebida de soya, leche esterilizada o las emulsiones preparadas (A-I) fueron adicionadas a 80 ml alicuotas de la natamicina disuelta.

Como un control una muestra con solamente natamicina fue preparada. (J)

40 4. El pH de cada una de las muestras fue reducido a 5.8 adicionando HCl (4N). Agua desmineralizada fue adicionada al volumen total de 100 ml por muestra.

Ejemplo 3

45 Este ejemplo describe la liberación de las diferentes formulaciones de natamicina sobre base diaria.

50 $50 \mu\text{l}$ de cada una de las muestras preparadas como se describió en el Ejemplo 2 (ejemplos A a J) fue aplicada a un disco como se describió en el Ejemplo 1.

55 La liberación de la natamicina de los discos fue determinada durante 3 días por el método descrito en el Ejemplo 1.

60

65

65

ES 2 285 747 T3

Los resultados son presentados en la Tabla 1.

TABLA 1

Liberación de natamicina ($\mu\text{g}/\text{disco}$) en base diaria

Comp. apropiados	Día		
	1	2	3
J (control)	2.5	1.8	1.7
A	8.4	7.6	6.7
B	7.8	5.4	5.3
C	4.2	2.3	2.2
D	6.0	7.4	6.0
E	2.7	2.0	2.1
F	11.3	11.6	5.5
G	9.3	7.7	5.8
H	7.5	6.0	4.0
I	7.8	6.0	4.1

El régimen de liberación de la mayor parte de los complejos de natamicina fue considerablemente más alto que el régimen de liberación del control. Esto significa que más natamicina estaba probablemente disponible para inhibir los mohos. Como se describió antes solamente la natamicina disuelta tiene actividad anti-fungicida. Solamente en el caso de formulación E (grasa de manteca) el régimen de liberación de la natamicina no es mejorado. En el caso de la formulación C (bebida de soya) solamente en el primer día fue observado un régimen de liberación más alto.

Ejemplo 4

Este ejemplo describe la actividad de los complejos de natamicina contra *Penicillium discolor*, un moho más tolerante el cual algunas veces provoca problemas de degradación en la industria del queso.

Una suspensión de esporas fue preparada raspando las esporas de un cultivo esporulado de *P. discolor* y suspendiendo las esporas en agua estéril con 0.05% de Tween.

La suspensión de esporas frescamente preparada fue mezclada con agar enmohecido hasta una concentración final de 10^2 esporas/ml de agar, y fueron preparadas placas de agar. En el medio de las placas fue hecho un orificio con un diámetro de 5 mm.

En el orificio 25 μl de las formulaciones A, B, C, D, F, I y J (del Ejemplo 2) fueron inyectados.

Las placas fueron incubadas durante 6 días a 24°C. Después de 2, 3 y 6 días las zonas de inhibición fueron medidas. Los resultados son presentados en la Figura 1.

La Figura 1 claramente demuestra que el *P. discolor* fue inhibido en una mayor extensión por las nuevas formulaciones que por la natamicina sola.

Ejemplo 5

Este ejemplo ilustra el efecto de los complejos de natamicina hacia el *Penicillium discolor* sobre el queso.

Las composiciones A, B, D, F y J fueron preparadas como se describió en el Ejemplo 2.

5 ml de cada composición fueron mezclados con 45 ml de Plasticoat® (una emulsión acuosa de acetato de polivinilo suministrada por National Starch and Chemicals B.V.) de manera tal que emulsiones de recubrimiento fueron obtenidas conteniendo 500 ppm de natamicina.

ES 2 285 747 T3

Además una emulsión de recubrimiento sin natamicina fue preparada como control (K). Las composiciones de recubrimiento fueron aplicadas a la superficie del queso Gouda de acuerdo al siguiente procedimiento:

5 Una rueda fresca de queso Gouda metida en salmuera fue primero cortada horizontalmente en dos partes. Cada parte fue entonces cortada en piezas de 5 por 5 por 5 cm. Solamente las piezas con una superficie de corteza plana fueron usadas en el experimento. Las piezas fueron sumergidas en un baño de parafina fundida a 80°C de manera tal que la superficie de la corteza quedó libre de parafina, mientras que las otras cinco superficies fueron cubiertas con una película delgada de parafina.

10 La superficie de la corteza fue entonces inoculada con alrededor de 1.9×10^3 CFU/cm² de una mezcla de esporas de tres cepas de *Penicillium discolor* (CBS números: 611.92, 612.92 y 613.92). La inoculación fue realizada aplicando 0.15 ml de una suspensión de spora conteniendo alrededor de 2×10^5 CFU/ml a la superficie de la pieza de queso. El inóculo fue equitativamente rociado sobre la superficie por medio de una torunda estéril, la cual estaba saturada con la suspensión de la spora.

15 Después de permanecer toda la noche en cajas plásticas cerradas a alrededor de 6°C, las piezas de queso fueron tratadas con las diferentes composiciones. Para cada tratamiento fueron tomadas 4 piezas de queso. En cada pieza 0.8 ml de la composición A, B, D, F, J o K fue aplicada y equitativamente rociada sobre la superficie por medio de una pieza rectangular estéril de plástico de alrededor de 2 por 5 cm. Después de permanecer durante 2 horas a condiciones ambientales, las piezas de queso fueron incubadas a 15°C con una humedad relativa de 95%.

20 Cada día el número de colonias visibles formadas sobre cada pieza de queso fue determinada y el número promedio por pieza fue calculado para cada tratamiento. Cuando el número de colonias sobre una pieza de queso excedió el valor de 50, la pieza de queso fue considerada totalmente cubierta con moho.

25 Los resultados son resumidos en la Figura 2.

30 Los resultados claramente demuestran la superioridad de las composiciones de acuerdo a la invención sobre la natamicina sola. La Figura 2 demuestra que las nuevas composiciones reducen la cantidad de colonias sobre las piezas de queso considerablemente. Aún después de 3 semanas de manera resistente ningún crecimiento fue observado, mientras que las piezas de control tratadas con natamicina (J) previnieron el crecimiento de moho solamente por 15 días.

Ejemplo 6

35 Este ejemplo ilustra el efecto de la concentración de caseinato de sodio hacia la liberación de la natamicina.

40 Una solución de caseinato de sodio al 15% fue preparada disolviendo 15 gramos de caseinato de sodio en 100 ml de agua.

Los complejos de natamicina preparados fueron como sigue.

1. 0.5 gramos de natamicina fueron disueltos en 75 ml de agua aumentando el pH a 11.5 usando NaOH (4N)
- 45 2. 25 (L), 20 (M), 15 (N), 10 (O), 5 (P), 1 (Q), 0.5 (R), o 0.1 (S) ml de caseinato de sodio disuelto (15%) fueron adicionados al agua.
3. El pH de cada una de las muestras fue reducido a 5.8 adicionando HCl(4N). Agua fue adicionada al volumen total de 100 ml por muestra.

50 Como control una muestra con natamicina solamente fue preparada (J).

50 μ l de cada muestra (formulaciones J y L a S) fueron aplicadas al disco como se describió en el Ejemplo 1.

55 La liberación de natamicina de los discos fue determinada durante 3 días por el método descrito en el Ejemplo 1.

La liberación de natamicina de la muestra control (J) se encontró que fue 2 microgramos por día.

60 La liberación de natamicina de las composiciones L, M, N, O, P y Q se encontró que fue 3.5 (Q) a más de 8 (L) veces mayor en el día 1.

En los días 2 y 3 la liberación de estas composiciones fue de 2 a 4 veces mayor que el control (J).

65 La liberación para las composiciones R y S fue mayor en el día 1 (5 microgramos de natamicina). El día 2 y 3 la liberación de natamicina fue comparable con el control (J).

ES 2 285 747 T3

Ejemplo 7

Este ejemplo describe la liberación de natamicina del complejo caseinato de sodio "N" (ver ejemplo 6) en Acetato de Polivinilo (PVA) usando la prueba de disolución.

La composición "N" fue preparada como se describió en el ejemplo 6.

Dicha composición fue mezclada con Plasticoat[®], una emulsión acuosa de PVA suministrada por National Starch & Chemical B.V., como sigue:

- * 5 ml de composición "N" fueron mezclados con 45 gramos de PVA (composición "N-PVA")
- * cada disco (ver ejemplo 1) fue cargado con 50 μ l de composición "N-PVa" (conteniendo 25 μ g de natamicina)
- * los discos fueron secados por incubación durante 24 horas a temperatura ambiente
- * los discos fueron colocados sobre placas de agar (ver ejemplo 1) e incubados durante 24 horas a 6°C
- * los discos fueron removidos de las placas de agar y colocados sobre una placa de agar fresca, después de lo que las placas pre-incubadas fueron incubadas durante 24 horas a 30°C
- * la cantidad de liberación de natamicina fue calculada como se describió en el ejemplo 1.

Como control una muestra con natamicina solamente en PVA fue preparado ("PVA-J").

La liberación de natamicina de los discos fue determinada durante 3 días. Los resultados son presentados en la tabla 2.

TABLA 2

Liberación de natamicina en PVA (μ g/disco) en base diaria

composición	Día		
	1	2	3
PVA-J	1.5	2.5	2.5
PVA-N	4.0	4.5	3.0

El régimen de liberación de la composición PVA-N es considerablemente mayor que el régimen de liberación del control. Esto significa que si la composición N es adicionada al recubrimiento de PVA, también más natamicina está disponible para inhibir los mohos.

Ejemplo 8

Este ejemplo describe el aislamiento y la estabilidad de las nuevas composiciones de natamicina.

La composición N fue preparada como se describió en el ejemplo 6. Un polvo fue producido como sigue:

- * 2.1 litros de la composición N fue preparada
- * la muestra fue secada usando un secador por rociado (Buchi) usando métodos bien conocidos los cuales resultan en 71 gramos de polvo (POW-N)
- * la composición en polvo fue almacenada a 6°C en botes cerrados.

La cantidad de natamicina después del secado por rociado (14.5%) (p/p) fue casi la misma que la cantidad máxima de natamicina que puede ser esperada (15.3%) (p/p) en base a la cantidad de natamicina que fue adicionada antes del secado por rociado.

La nueva composición no es inactivada por el proceso de secado por rociado.

ES 2 285 747 T3

La estabilidad de la composición en polvo fue determinada midiendo el contenido de natamicina del polvo por HPLC (de acuerdo a IDF estándar 140, International Dairy Federation, 1987) inmediatamente después de la preparación y después de 28 días de almacenamiento a 20°C en la oscuridad.

5 No hubo cambio significativo en la concentración de natamicina después de 28 días de almacenamiento. Inmediatamente después de la producción y después de 28 días de almacenamiento la concentración de natamicina fue 14.5% (p/p).

10 La composición en polvo "POW-N" fue disuelta en agua y adicionada al PVA a una concentración final de 250 ppm. La estabilidad de la natamicina en esta nueva formulación (POW-PVA-N) fue determinada midiendo el contenido de natamicina inmediatamente después de la preparación y después de 28 días de almacenamiento a 15°C en la oscuridad. En ambos casos la concentración de natamicina fue 250 ppm.

15 La liberación de la natamicina de la formulación "POW-N" inmediatamente después de la producción y después de 4 semanas de almacenamiento a 6°C fue determinada como sigue:

* "POW-N" fue disuelta en agua a una concentración final de 5000 ppm

20 * cada disco (ver ejemplo 1) fue cargado con 50 µl de la formulación disuelta (conteniendo 250 µg de natamicina)

* los discos fueron colocados sobre placas de agar (ver ejemplo 1) e incubados por 24 horas a 6°C

25 * los discos fueron removidos de las placas de agar y colocados sobre una placa de agar fresca, después de lo cual las placas pre-incubadas fueron incubadas durante 24 horas a 30°C

* la cantidad de liberación de natamicina fue calculada como se describió en el ejemplo 1.

Los resultados son presentados en la tabla 3.

30 La liberación de natamicina de la formulación "POW-PVA-N" inmediatamente después de la producción y después de 4 semanas de almacenamiento a 15°C fue determinada como sigue:

35 * la composición en polvo "POW-N" fue disuelta en agua y adicionada al PVA a una concentración final de 500 ppm (POW-PVA-N)

* cada disco (ver ejemplo 1) fue cargado con 50 µl de la composición "POW-PVA-N" (conteniendo 25 µg de natamicina)

40 * los discos fueron secados por incubación durante 24 horas a temperatura ambiente

* los discos fueron colocados en placas de agar (ver ejemplo 1) e incubadas durante 24 horas a 6°C

45 * los discos fueron removidos de las placas de agar y colocados sobre una placa de agar fresca, después de lo que las placas pre-incubadas fueron incubadas durante 24 horas a 30°C

* la cantidad de liberación de natamicina fue calculada como se describió en el ejemplo 1.

Los resultados son presentados en la tabla 3.

50

TABLA 3

Liberación de natamicina (µg/disc) inmediatamente después de la producción y después de 4 semanas de almacenamiento

55

Composición	Fresca	28 días
POW-N	43.0	43.0
PVA-POW-N	3.5	3.5

60

65 Nota: la liberación de una formulación de PVA es siempre menor, debido a las propiedades de retardo de la matriz de PVA.

ES 2 285 747 T3

Estos resultados claramente demuestran que las nuevas formulaciones, cuando son producidas como un polvo o cuando son formuladas en PVA, son estables y mantienen su actividad mejorada.

Ejemplo 9

Este ejemplo ilustra el efecto de las nuevas composiciones de natamicina hacia los mohos sobre el queso Edam. El experimento fue realizado en una fábrica de queso en la cual el queso Edam fue producido. Al momento de las pruebas de campo hubo problemas de moho causado por el *Penicillium discolor*. Esta fábrica de queso fue seleccionada para demostrar la actividad intensificada hacia especies de moho de menos sensibilidad en la práctica.

Composiciones de recubrimiento fueron preparadas como sigue:

1 El recubrimiento A fue preparado como "POW-PVA-N" (ver ejemplo 8), la única diferencia con "POW-PVA-N" fue que el recubrimiento A contiene 500 ppm de natamicina.

2 El recubrimiento B fue un Plasticoat[®] estándar conteniendo 500 ppm de natamicina estándar.

96 Quesos Edam de 2.5 kg fueron producidos usando métodos bien conocidos. 48 Quesos fueron tratados con el recubrimiento A, 48 quesos fueron recubiertos con el recubrimiento B usando métodos bien conocidos. Los quesos fueron recubiertos dos veces (aproximadamente 7 gramos de recubrimiento por queso por tratamiento). Después del tratamiento con salmuera los quesos fueron almacenados durante 3 días, después de lo que los quesos secados fueron tratados con un recubrimiento por primera vez. Después de 5 días los quesos fueron volteados. El segundo tratamiento fue después de 8 días. Después de 11 días los quesos fueron volteados. Los quesos fueron almacenados para su madurado bajo condiciones estándares (humedad relativa de 87%, temperatura de 11°C).

21 Días después de la producción los quesos fueron visualmente examinados para determinar el crecimiento de moho sobre la superficie. En 22 quesos tratados con el recubrimiento estándar (recubrimiento B) fueron observadas colonias de moho. En los quesos tratados con la nueva formulación (recubrimiento A) solamente sobre 3 quesos fueron observadas colonias de moho. Estos resultados demuestran que la nueva composición es también más efectiva para combatir mohos en el Queso Edam producido y almacenado en una fábrica de queso.

ES 2 285 747 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un complejo que comprende natamicina acomplejada a una o más proteínas o amino ácidos, cuando está presente en agua, no produce cristales visibles usando un microscopio que tiene una magnitud de 400x.
2. Un complejo de acuerdo a la reivindicación 1, el cual cuando está presente en agua no pierde sustancialmente actividad dentro de 60 días.
- 10 3. Un complejo de acuerdo a la reivindicación 1 donde la proporción de natamicina a la cantidad total de proteína o amino ácido es 10,000:1 a 1:10.
4. Un complejo de acuerdo a la reivindicación 3 donde la proporción de natamicina a la cantidad total de proteína o amino ácido es 100:1 a 1:1.
- 15 5. Un complejo de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones precedentes donde al menos una de las proteínas es una proteína de la leche.
6. Un complejo de acuerdo a la reivindicación 5 donde la proteína de la leche comprende una proteína del suero de la leche, caseína o caseinato.
- 20 7. Una composición que comprende un complejo de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones precedentes y una grasa o aceite.
- 25 8. Una composición de acuerdo a la reivindicación 7 donde al menos las proteínas presentes en el complejo y la grasa o el aceite provienen de la leche.
9. Una composición de acuerdo a la reivindicación 8 donde la leche es leche de vaca o leche de soya.
- 30 10. Un proceso para preparar un complejo como se definió en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 el proceso comprendiendo:
- disolver la natamicina en un solvente;
- mezclar la natamicina disuelta como una o más proteínas; y opcionalmente aislar el complejo formado.
- 35 11. Un proceso de acuerdo a la reivindicación 10 donde el solvente es un líquido acuoso y la disolución de la natamicina es lograda reduciendo o aumentando el pH.
- 40 12. Un proceso de acuerdo a la reivindicación 11 donde el complejo es formado ajustando el pH de la mezcla de natamicina disuelta y la proteína entre 5 y 9.
13. Un proceso de acuerdo a la reivindicación 10 donde el solvente es un solvente orgánico y el complejo es formado en este solvente o un líquido que comprende este solvente.
- 45 14. Uso de un complejo como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una composición como la reivindicada en cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 como un tratamiento antimicótico preventivo para productos naturales siendo un producto alimenticio o un producto agrícola.
- 50 15. Un producto natural siendo un producto alimenticio o un producto agrícola el cual ha sido tratado con una complejo como el reivindicado en las reivindicaciones 1 a 6 o una composición como la reivindicada en las reivindicaciones 7 a 9.
- 55
- 60
- 65

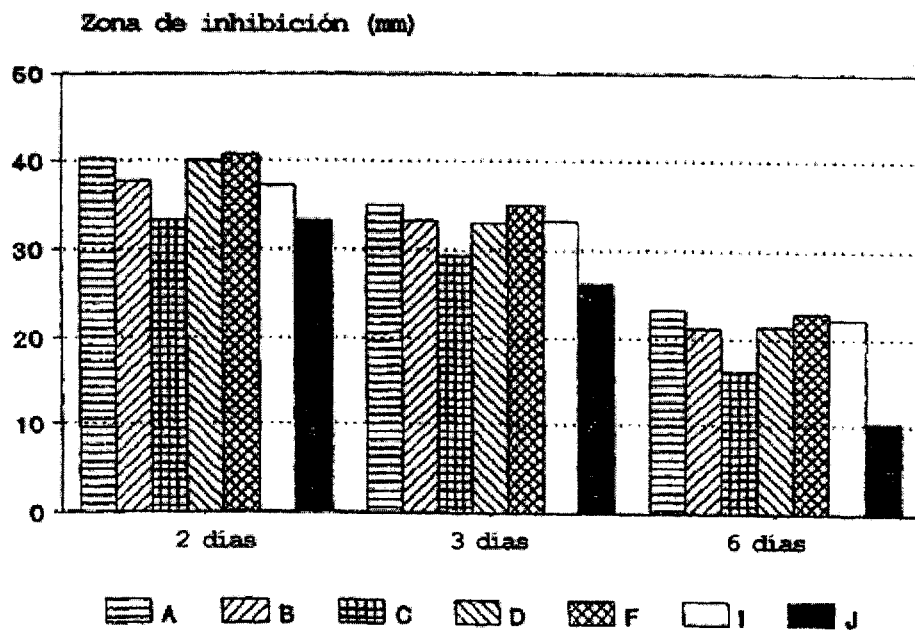


FIG. 1

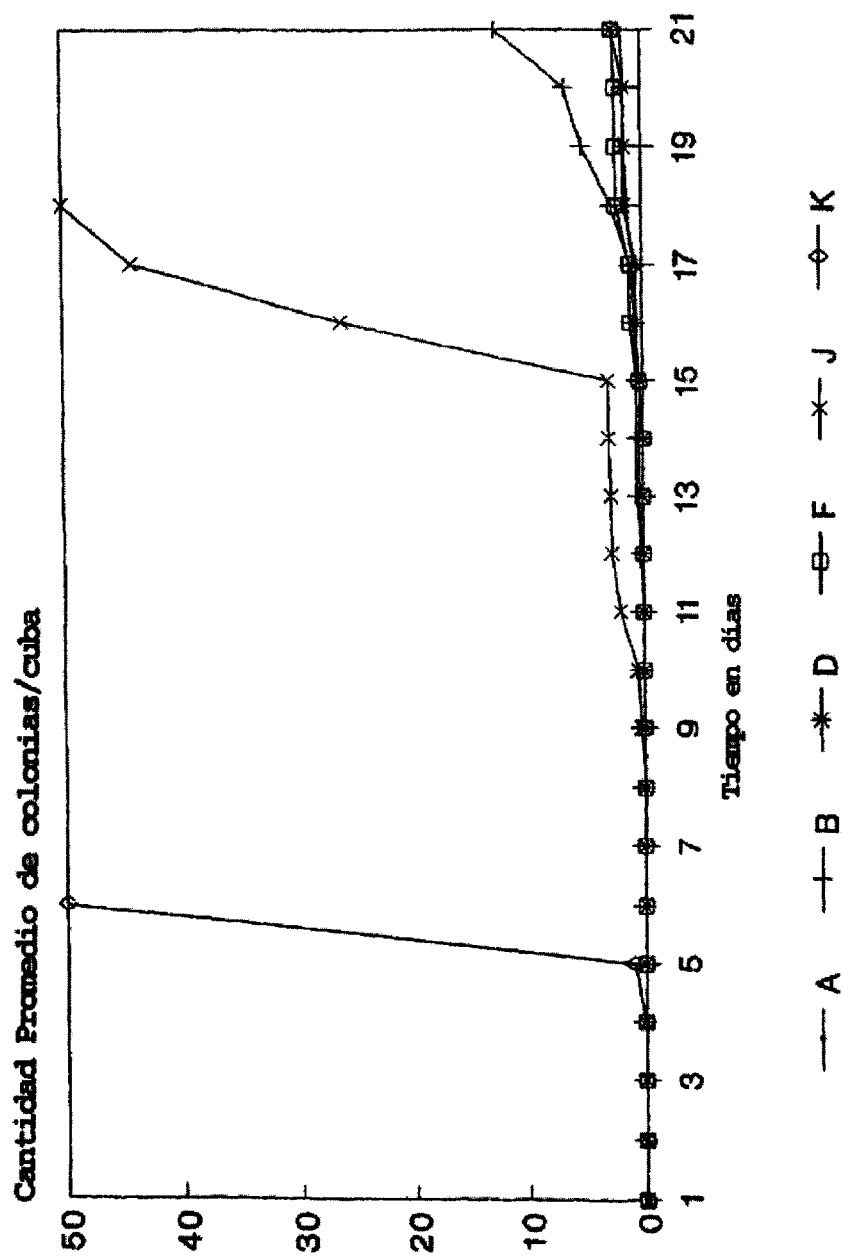


FIG. 2