

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

(21) PI 0714765-1 A2



(22) Data de Depósito: 20/07/2007
(43) Data da Publicação: 16/07/2013
(RPI 2219)

(51) Int.Cl.:
A23L 3/3472
A23L 3/3463

(54) Título: MICELAS ANTIMICRIBIANAS PARA APLICAÇÕES ALIMENTARES

(30) Prioridade Unionista: 09/08/2006 EP 06 016639.4

(73) Titular(es): Nestec S.A.

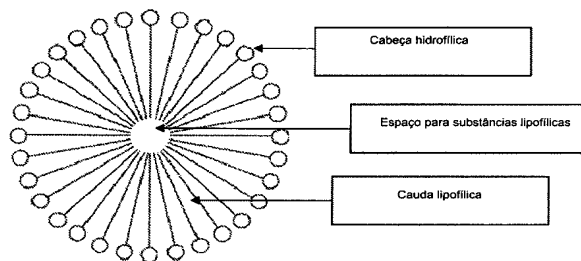
(72) Inventor(es): Derrick A. Bautista, Guillermo Eduardo Napolitano, Günter Kirchner, Kathrin Benz

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

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007057526 de 20/07/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/017580de 14/02/2008

(57) Resumo: MICELAS ANTIMICROBIANAS PARA APLICAÇÕES ALIMENTARES. A presente invenção refere-se a métodos para melhorar a segurança microbiológica e a estabilidade do alimento pelo uso de micelas de grau alimentício que encapsulam agentes antimicrobianos. A invenção também se relaciona às composições alimentares assim obtidas.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MICELAS
ANTIMICROBIANAS PARA APLICAÇÕES ALIMENTARES**".

Campo da Invenção

5 A presente invenção refere-se a métodos para melhorar a segurança microbiológica e a estabilidade de alimentos pelo uso de micelas de grau alimentício que encapsulam agentes antimicrobianos. A invenção também se relaciona às composições alimentares assim obtidas.

Antecedentes da Invenção

10 A contaminação microbiana do alimento pode ser um risco considerável à saúde. Ela pode levar a distúrbios gastrointestinais severos e é também a suposta causa da "diarreia de verão" que está associada à náusea, vômito, diarreia e febre. Micro-organismos nocivos também podem conter ou excretar toxinas potentes que podem levar à perigosa contaminação, por exemplo, carne contendo uma toxina causadora de botulismo. Em certos
15 casos, o micro-organismo também pode ser carcinogênico (por exemplo, micotoxinas de fungos específicos).

Deterioração alimentar ou intoxicação alimentar são normalmente prevenidas por uma combinação de diferentes barreiras (por exemplo, aquecimento, atividade de água reduzida, distribuição refrigerada, presença
20 de conservantes) que inibem ou destroem completamente bactérias, levedura e fungos.

Contudo, os conservantes que são legalmente aprovados e comumente usados ainda podem ser nocivos para alguns consumidores. Por exemplo, ácido benzóico e ácido sórbico podem causar alergias, enquanto
25 sulfito, ácido sulfuroso, e dióxido de enxofre podem ter efeitos deletérios adicionais. Os conservantes usados em produtos de carne conservada também podem liberar compostos carcinogênicos quando aquecidos além de 12°C.

Há assim uma tendência para busca de alternativas inofensivas que possam ser usadas em produtos alimentícios. Entre estas, condimentos
30 e/ou extratos de várias plantas ou frutos têm demonstrado ser agentes antimicrobianos eficazes. Por exemplo, Weiss J. *et al.* no Journal of Food Protection, Vol. 68, No. 12, 2005, p.2559-2566 e no Journal of Food Protection,

vol. 68, No. 7, 2005, p.1359-1366 descreve o efeito antimicrobiano de componentes de óleos essenciais.

O problema com a inclusão desses em produtos alimentares, no entanto, é que o sabor do produto alimentar pode ser alterado, ou sua solubilidade, portanto, problemas de estabilidade/eficiência podem surgir.

Objetivo da Invenção

Permanece, portanto, uma necessidade de prover uma maneira melhorada de preparação de composições alimentares mais resistentes a micro-organismos nocivos.

10 Sumário da Invenção

Assim sendo, a presente invenção provê, em um primeiro aspecto, uma composição alimentar compreendendo ingredientes nutricionais e micelas que incorporam pelo menos um agente antimicrobiano.

Um segundo aspecto da invenção refere-se a um método para melhorar a segurança microbiológica e a estabilidade do alimento compreendendo as etapas de:

- a. Preparação de uma emulsão que compreende micelas tensoativas de grau alimentício incorporando pelo menos um agente antimicrobiano, e
- 20 b. Incorporação da dita emulsão em uma composição alimentar.

O uso de uma emulsão compreendendo micelas tensoativas de grau alimentício que incorporam pelo menos um agente antimicrobiano na produção, armazenamento ou preparação de uma composição alimentar é também parte da presente invenção.

25 De acordo com outro aspecto da invenção, um método para melhorar a segurança microbiológica e a estabilidade do alimento que compreende as etapas de

- a. preparação de uma emulsão compreendendo micelas de tensoativas de grau alimentício que incorporam pelo menos um agente antimicrobiano a fim de melhorar a percepção sensorial do dito agente antimicrobiano, e
- 30 b. incorporação da dita emulsão em uma composição alimentar

é fornecida.

Um produto antimicrobiano seco compreendendo uma tensoativa de grau alimentício e um agente antimicrobiano que, sob hidratação, tem a capacidade de gerar uma emulsão de micelas que incorporam o dito agente antimicrobiano e o uso dos ditos produtos secos constituem aspectos adicionais da presente invenção.

Figuras

A presente invenção é descrita a seguir com referência a algumas modalidades mostradas nas figuras em que:

- 10 - figura 1 mostra uma visão simplificada de uma micela tensoativas em água,
- figura 2 compara o crescimento de *E. coli* DSM 6367 em um caldo cozido (caldo de "Chakalaka") com e sem as micelas que incorporam um agente antimicrobiano,
- 15 - figura 3 compara o crescimento de *E. coli* DSM 6367 em escabeche com e sem as micelas que incorporam um agente antimicrobiano,
- figura 4 mostra a inibição do crescimento *in vitro* de *Lactobacillus buchneri* por dois tipos de micelas tensoativas sem e com um agente antimicrobiano, e
- 20 - figura 5 mostra a inibição do crescimento *in vitro* de *E. coli* por dois tipos de micelas tensoativas sem e com um agente antimicrobiano.
- figura 6 mostra a inibição do crescimento *in vitro* da *Salmonella* dos óleos de cravo, orégano e mostarda encapsulados em micelas.
- figura 7 mostra a inibição do crescimento *in vitro* de *Staphylococcus aureus*, *Listeria* spp., *E. coli* do óleo de cravo encapsulado em micelas.
- 25
- figura 8 mostra a inibição do crescimento *in vitro* de *Staphylococcus aureus*, *Listeria* spp., *E. coli* do óleo de orégano encapsulado em micelas.
- 30 - figura 9 mostra a inibição do crescimento de vários fungos e leveduras em uma pasta alimentar (pimenta/coentro) com óleo de mostarda encapsulado em micelas.

- figura 10 mostra a inibição do crescimento pelo óleo de mostarda encapsulado em micelas em pasta alimentar de capim-limão/gengibre e pimenta/coentro

5 - figura 11 mostra a contagem de *Salmonella* spp. em amostras de frango submergidas em um escabeche que compreende óleo de orégano encapsulado em micelas em concentrações variadas depois de 30 minutos.

Descrição Detalhada da Invenção

10 A fim de criar composições alimentares que sejam resistentes a micro-organismos nocivos, a presente invenção propõe uma composição alimentar que compreende ingredientes nutricionais e micelas tensoativas de grau alimentício.

15 Micelas são representadas na figura 1. Elas consistem de uma reunião de moléculas de tensoativo supramolecularmente dispostas para formar uma estrutura esférica com um núcleo lipofílico e uma superfície hidrofílica.

20 As tensoativas usadas para produzir as micelas são tensoativos de grau alimentício que podem ser selecionados a partir da classe de tensoativos de mono-oleato de polioxietileno sorbitano (Admul T 80 K) ou podem ser selecionados de fontes animais ou vegetais que têm propriedades ativas emulsificantes. De acordo com a presente invenção, o núcleo lipofílico compreende um agente antimicrobiano tal que o agente antimicrobiano seja encapsulado na micela.

25 O agente antimicrobiano pode ser selecionado de extratos de óleos essenciais. Óleos essenciais incluem óleo de cravo, óleo baio, óleo de canela, óleo de orégano, óleo de tomilho, óleo de cominho, óleo de endro, óleo de coentro, óleo de citros, óleo de laranja, etc. Em uma modalidade, o agente antimicrobiano é selecionado de eugenol, limoneno, carvacrol e qualquer mistura dos mesmos. Também pode ser selecionado de outros óleos essenciais.

30 Em uma modalidade preferencial, o agente antimicrobiano é selecionado de óleo de cravo, óleo baio, óleo de canela, óleo de orégano, óleo de tomilho, óleo de cominho, óleo de endro, óleo de coentro, óleo de citros,

óleo de laranja, óleo de mostarda ou qualquer combinação dos mesmos. Mais preferivelmente, o agente antimicrobiano é o óleo de cravo, o óleo de orégano, o óleo de mostarda ou qualquer combinação dos mesmos.

5 Devido a sua baixa ou não-solubilidade em água, estes compostos são favoravelmente incorporados no núcleo lipofílico das micelas.

As presentes micelas tensoativas na composição alimentar da invenção podem, assim, compreender pelo menos um agente antimicrobiano.

10 Desta maneira, o agente antimicrobiano está presente na composição alimentar da invenção em uma concentração entre 0,05 a 1,5% em peso da composição.

A composição alimentar da invenção também compreende ingredientes nutricionais que podem ser selecionados de carboidratos, gorduras, proteínas, fibras, minerais, vitaminas e qualquer mistura dos mesmos.

15 A composição alimentar pode ser água, em particular águas engarrafadas aromatizadas, molhos, escabeches, maioneses, mostardas, ketchups, cremes à base de maionese para salada, molhos para salada, sopas, frutas em conserva, produtos lácteos, carnes, peixe, vegetais, etc. Podem ser sem gordura, com baixo teor de gordura ou teor de gordura médio até
20 um conteúdo de gordura de 50%.

Por água engarrafada aromatizada entende-se qualquer água mineral que contém algum aromatizante natural ou artificial, por exemplo, exemplo menta, limão, laranja, etc. A água também pode conter uma fonte de açúcares.

25 O pH da composição alimentar pode variar entre 2 e 8, e está preferivelmente entre 3 e 7, mais preferivelmente entre 5 e 7. Isto constitui uma vantagem em relação aos produtos em que é necessário um pH baixo, a fim de garantir a segurança microbiológica.

30 Em uma modalidade, a composição alimentar não compreende sal. Em uma modalidade adicional, a atividade de água da composição alimentar é mais de 0,5, preferivelmente mais de 0,7, mesmo mais preferivelmente mais de 0,8.

Preferivelmente, as composições da invenção são livres de aditivos. Por aditivos se quer dizer qualquer conservante, E-number, etc. que é acrescentado com o objetivo de conservação/estabilidade. Assim, a presente invenção provê composições alimentares com etiquetas limpas.

5 Além disso, a presença das micelas permite ao produto ser armazenado à temperatura ambiente e ser estável para armazenamento sem comprometer a segurança microbiológica. Os métodos tradicionais para assegurar a segurança microbiológica, tais como redução do pH do produto, aumento do conteúdo de sal, refrigeração do produto etc., podem não ser
10 mais necessários.

Agentes antimicrobianos, tais como os descritos acima podem ter um gosto forte, perceptível, que pode não ser sempre compatível com a composição alimentar à qual eles podem ser acrescentados. Uma vantagem adicional da presente invenção é que pelo encapsulamento do agente anti-
15 microbiano em uma estrutura micelar, a percepção sensorial do dito agente antimicrobiano é reduzida. Deste modo, uma quantidade maior do agente antimicrobiano pode ser usada sem comprometer as propriedades organolépticas da composição alimentar. Isto resulta em composições alimentares que são altamente resistentes à contaminação microbiológica permanecendo
20 altamente palatáveis.

A composição alimentar da invenção está microbiologicamente segura contra bactérias patogênicas, leveduras e fungos. Por “microbiologicamente seguro” se quer dizer que nenhum crescimento de microorganismos patogênicos pode ser observado durante o prazo da validade
25 desejado do produto. A composição alimentar é também estável à deterioração microbiológica, significando que nenhum crescimento de microorganismos de deterioração (bactéria, levedura, fungos) pode ser observado durante o prazo de validade desejado do produto.

É também estável durante o armazenamento, uma vez que ele
30 não se deteriora na temperatura ambiente durante o período de pelo menos 6 meses, preferivelmente pelo menos 1 ano.

É também estável abaixo de temperaturas de refrigeração, uma

vez que ele não se deteriora durante o período de pelo menos 1 mês, preferivelmente pelo menos 2 meses.

5 Deste modo, a invenção provê um método de melhorar a segurança microbiológica e a estabilidade dos alimentos. O método compreende em uma primeira etapa, a preparação de uma emulsão que compreende micelas tensoativas de grau alimentício que incorporam pelo menos um agente antimicrobiano.

10 A emulsão é preparada misturando uma tensoativa de grau alimentício em um meio aquoso para formar micelas, e então, acrescentando o agente antimicrobiano à emulsão micelar. Preferivelmente, o agente antimicrobiano é adicionado com agitação durante um período de tempo, normalmente aproximadamente 10 a 15 minutos.

15 Preferivelmente o agente antimicrobiano é selecionado de óleo de cravo, óleo baio, óleo de canela, óleo de orégano, óleo de tomilho, óleo de cominho, óleo de endro, óleo de coentro, óleo de citros, óleo de laranja, óleo de mostarda ou qualquer combinação dos mesmos. Mais preferivelmente, é óleo de cravo, óleo de orégano, óleo de mostarda ou qualquer combinação dos mesmos.

20 A quantidade da substância antimicrobiana a ser adicionada pode ser facilmente determinada por medições de turbidez. Aliás, o agente antimicrobiano é disperso na água encapsulado na micela. Quando a turbidez aparece na solução aquosa, é uma indicação de que o agente antimicrobiano, que é pobremente ou não-solúvel em água, não está mais sendo incorporado nas micelas. Tipicamente, a concentração de agente antimicrobiano
25 no meio aquoso é pelo menos 0,1%, preferivelmente até 3%.

A emulsão assim preparada é então incorporada em uma composição alimentar. Preferivelmente, é incorporada em uma quantidade até 80% em peso da composição alimentar.

30 A composição alimentar pode ser água, em determinadas águas aromatizadas engarrafadas, molhos, escabeches, maioneses, mostardas, ketchups, cremes à base de maionese para salada, molhos de salada, sopas, frutas em conserva, produtos lácteos, carnes, peixe, vegetais etc. Tipi-

camente, a composição alimentar é sensível a fungos, leveduras e/ou bactérias.

5 O uso de uma emulsão que compreende micelas tensoativas de grau alimentício que incorporam pelo menos um agente antimicrobiano na produção, armazenamento ou preparação de uma composição alimentar é também parte da presente invenção.

10 Deste modo, a emulsão pode ser usada na etapa de fabricação nas fábricas, em restaurantes para preparação de alimentos, ou mesmo em casa, pelo consumidor. O uso da dita emulsão, então, melhora a segurança microbiológica e a estabilidade da dita composição alimentar.

A emulsão pode ser guardada sob condições ambientes, resfriada ou congelada.

15 Particularmente, a emulsão que compreende micelas tensoativas de grau alimentício que incorporam pelo menos um agente antimicrobiano pode ser usada para inibir a atividade de bactérias, fungos, e leveduras, tais como *Escherichia* spp., *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Listeria* spp., *Lactobacillus* spp., *Salmonella* spp., *Penicillium* spp., *Saccharomyces* spp., *Debaryomyces* spp., *Pichia* spp., *Mucor* spp., *Eurotium* spp.

20 Mais especificamente, é usada para inibir a atividade de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus buchneri*, *Salmonella enterica*, *Penicillium chrysogenum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia farinosa*, *Mucor plumbeus*.

25 Em uma modalidade preferencial, a emulsão compreende micelas tensoativas de grau alimentício que incorporam óleo de orégano. Esta emulsão é particularmente útil para a inibição completa da *Salmonella* spp. Aliás, é muito eficaz para tratar alimentos sensíveis a *Salmonella*, como toda a *Salmonella* é inibida dentro de 5 minutos após a emulsão entrar em contato com a dita *Salmonella*. Tal emulsão pode encontrar a aplicação, por exemplo, como um molho de escabeche para frango, para aplicações cozidas
30 no micro-ondas etc.

Em outra modalidade, a emulsão compreende micelas tensoati-

vas de grau alimentício que incorporam óleo de mostarda. Esta emulsão é particularmente útil em produtos alimentares que são sensíveis a contaminação por fungos. Estes são normalmente molhos que são projetados para ter um prazo da validade longo.

5 Em outra modalidade da invenção, um método para melhorar a segurança microbiológica e a estabilidade do alimento é proporcionado, compreendendo a etapa de preparação de uma emulsão compreendendo micelas tensoativas de grau alimentício que incorpora pelo menos um agente antimicrobiano a fim de melhorar ou reduzir a percepção sensorial do dito
10 agente antimicrobiano e então incorporando a dita emulsão em uma composição alimentar.

 A presente invenção também inclui um produto antimicrobiano seco que compreende um tensoativo de grau alimentício e um agente antimicrobiano. O tensoativo de grau alimentício pode ser selecionado a partir
15 da classe de tensoativos de mono-oleato de polioxietileno sorbitano (Admul T 80 K) ou pode ser selecionado de fontes animais ou vegetais que têm propriedades ativas emulsificantes. O agente antimicrobiano pode ser selecionado de eugenol, limoneno, carvacrol e/ou outros óleos essenciais. Preferivelmente, o agente antimicrobiano é selecionado de óleo de cravo, óleo bai-
20 o, óleo de canela, óleo de orégano, óleo de tomilho, óleo de cominho, óleo de endro, óleo de coentro, óleo de citros, óleo de laranja, óleo de mostarda ou qualquer combinação dos mesmos. Mais preferivelmente, é óleo de cravo, óleo de orégano, o óleo de mostarda ou qualquer combinação dos mesmos.

25 O produto seco, tal que, após a hidratação, uma emulsão de micelas que incorporam o dito agente antimicrobiano é gerada. Por isso, atua como um precursor das emulsões micelares antimicrobianas descritas acima.

 Pode ser armazenado sob condições ambientes, resfriado ou
30 congelado e pode ser usado em composições alimentares secas, tais como, sopa de pacote, leite em pó, bebidas em pó, etc.

 Como um resumo, a presente invenção provê os benefícios ob-

tidos pela segurança microbiológica e estabilidade do alimento, enquanto é mantida a palatabilidade do dito alimento. A necessidade de pasteurização ou maior processamento térmico de produtos alimentícios pode ser reduzida ou eliminada. A invenção também oferece o benefício de valores mais altos de pH e redução do ácido, sal, conteúdo de açúcar ou conservante pode ser obtida em produtos alimentares sem comprometer a segurança microbiológica. A invenção também permite aumentar a estabilidade do prazo de validade de produtos alimentares. Além disso, ele permite reduzir o risco de recontaminações microbiológicas dos alimentos. Finalmente, as micelas que têm agentes antimicrobianos encapsulados são facilmente geradas e podem substituir conservantes indesejáveis, "E-numbers", etc. tal que a marcação limpa possa ser realizada.

A presente invenção é ainda ilustrada por exemplos não limitados.

15 Exemplos

Exemplo 1a: teste *in vitro*

Meios de cultura usados:

- M.R.S-Bouillon, Merck, 1,10661
- Bile Verde Brilhante 2% (Caldo), Oxoid, CM0031
- 20 - Peptona de caseína pancreaticamente digerida, Merck, 1,07213
- D(+)-Glicose, Merck, 1,08337

Ágares usados:

- Ágar M.R.S., Oxoid, CM 0316
- Ágar Bile Triptona de X-glicoronida, Merck, 1,16122

25 Emulsificadores usados:

- Surfino 495W, Air Products Nederland BV, S-485W
- Admul T 80 K, Kerry Bio-Science, 5Z10754

Componentes de óleo essencial usados:

- Eugenol, Fluka, 41600
- 30 - Carvacrol, Fluka, 22051
- R(+)-Limoneno, Fluka, 62119

Micro-organismos usados:

- *Lactobacillus buchneri* DSM 20174 418*/Nº

- *E. coli* SLV 082 504*

Todas as emulsões foram preparadas com água destilada e deionizada.

5 As micelas "vazias" foram produzidas misturando o emulsificador com a água.

O objetivo foi encapsular nessas micelas os componentes principais de óleos essenciais com efeitos antimicrobianos. Estes componentes foram eugenol, R-Limoneno e carvacrol, que podem ser encontrados, por exemplo, em óleo de cravo, óleo de laranja e óleo de tomilho.

A turbidez da solução foi usada como controle visual:

Como a solução estava homogênea e incolor após a produção e o armazenamento durante a noite foi determinado como bem sucedido o encapsulamento das substâncias nas micelas.

15 Os melhores resultados foram obtidos com uma emulsão clara e homogênea de água-em-óleo.

Componentes de óleo essenciais com concentrações abaixo de 0,1% não mostraram efeito antimicrobiano satisfatório, enquanto a concentração muito mais alta dos componentes de óleo essenciais (até 3%) proporcionou efeito antimicrobiano aumentado.

Para produzir as micelas foi necessário testar diferentes concentrações de água/emulsificador/antimicrobiano para avaliar a melhor combinação para o encapsulamento.

25 Um meio mínimo composto de uma solução de glicose peptona misturada com as micelas foi usado como meio de cultura.

As concentrações (todas as concentrações estão em porcentagem em peso, p/p) foram as seguintes:

- peptona a 0,1%

- glicose a 1,0%

30 - Eugenol a 1,0%

- emulsificador a 5,0% (ambos os emulsificadores foram testa-

dos)

- água a 92,9%

Como controle negativo, uma solução de água, peptona e glicose foi usada.

Os efeitos antimicrobianos foram testados em duas bactérias (*E. coli* e *Lactobacillus*) e um antimicrobiano encapsulado (eugenol) foi testado.

Cada teste foi realizado em triplicata.

Após a pesagem inicial e mistura das substâncias o pH foi ajustado. O pH foi 4,5 para *Lactobacillus* e 5,0 para *E. coli*. Antes da inoculação as amostras foram filtradas (0,20 µm) sob condições estéreis.

A contagem inicial de células nas amostras foi 10⁴ CFU/ml. As amostras foram incubadas durante 7 a 12 dias a 25°C e uma contagem bacteriana diária foi feita.

Em ambos os testes uma clara inibição com micelas contendo eugenol em *Lactobacillus buchneri* e *E. coli* foi demonstrada (conferir figura 4 e 5)

Exemplo 1b a 1d

As mesmas condições *in vitro* como descritas acima foram usadas para testar as propriedades antimicrobianas de óleos essenciais encapsulados em micelas, particularmente óleo de cravo, óleo de orégano e óleo de mostarda.

Exemplo 1b

Como pode ser visto na figura 6, *Salmonella spp.* foi inativada pelos três óleos essenciais. O óleo de orégano mostra a inativação mais forte, uma vez que, é capaz de matar rapidamente a *Salmonella spp.*, dentro de aproximadamente cinco minutos depois da inoculação.

Exemplo 1c

Como pode ser visto na figura 7, a óleo de cravo encapsulado na micela foi eficaz contra o crescimento dos micro-organismos *Staphylococcus*, *Listeria* e *E. coli*.

Exemplo 1d

A figura 8 mostra o efeito de óleo de orégano, encapsulado em micelas contra o crescimento dos micro-organismos *Staphylococcus*, *Listeria*

e *E. coli*.

Exemplo 2: Teste *in situ*

Produtos usados:

- caldo Chakalaka Maggi®
- 5 - Escabeche livre de gordura que contém suco de frutas, alho, gengibre e mel.

Ágar usado:

- Placa de petri pronta pra uso de Ágar-ágar padrão para contagem (PCA)
- 10 - Ágar M.R.S., Oxoid, CM 0316
- Ágar Bile Triptonas de X-glicoronida, Merck, 1,16122

Emulsificadores usados:

- Admul T 80 K, Kerry Bio-Science, 5Z10754

Componentes de óleos essenciais usados:

- 15 - Eugenol, Fluka, 41600

Micro-organismo usado:

- *E. coli* DSM 6367

Todas as soluções foram preparadas com água destilada e deionizada.

- 20 O objetivo deste experimento foi um prolongamento do prazo de validade em dois produtos diferentes ou uma elevação do pH dos produtos pela adição de micelas contendo eugenol.

- 25 Os produtos alimentares selecionados foram um escabeche sem gordura e um caldo cozido com baixo teor de gordura de 3% (Chakalaka).

A concentração máxima de eugenol que foi encapsulada em emulsificador a 5% foi eugenol a 1%.

- 30 No início do experimento, os dois produtos são misturados com a emulsão micelar de acordo as concentrações anteriormente determinadas (p/p), colocados em vidros e ajustados ao valor de pH desejado.

As concentrações foram como se segue:

Chakalaka: emulsão micelar a 40% e caldo Chakalaka a 60%

Escabeche: emulsão micelar a 60% e Escabeche a 40%

A concentração de eugenol por 100g de caldo Chakalaka foi de 0,4%, e 0,6% de eugenol por 100g escabeche.

5 O pH das amostras inoculadas com *E. coli* foi 5,0. Quatro amostras diferentes foram produzidas, as quais foram posteriormente inoculadas.

Durante a inoculação com as bactérias *E. coli* DSM 6367, bem como durante a preparação das amostras, condições estéreis foram usadas.

As amostras foram incubadas a 20°C durante uma semana.

10 O crescimento bacteriano foi verificado diariamente pela contagem bacteriana para confirmar os efeitos inibitórios das micelas.

A determinação de contagem celular também foi feita em placas de Petri prontas para uso PCA no começo e no fim do teste para fornecer uma visão geral da flora bacteriana existente no produto.

15 Pela repetição dos experimentos, os resultados do primeiro teste podem ser reproduzidos e os efeitos inibitórios das micelas demonstrados satisfatoriamente.

Em ambos os testes (figuras 2 e 3), foi demonstrada uma clara inibição do crescimento pelas micelas.

Exemplo 3

20 Um coquetel de leveduras e fungos foi preparado. Estes foram *Saccharomyces cerevisiae* 208, *Debaromyces hansenii* 233, *Pichia farinosa* 200, *Mucor plumbeus* N° 728, *Penicillium chrysogenum* N° 722, *Eurotium spp.* N° 700. Estes foram inoculados em pré-culturas.

25 As micelas foram preparadas separadamente pela mistura de Admul T80K 10% com 88% de água destilada. O óleo de mostarda (2%) foi lentamente adicionado à solução até ficar completamente suspenso na solução.

30 Uma pasta alimentar de pimenta/coentro ou capim-limão/gengibre (75%) com níveis de sal variados (0% de sal e 12% de sal) foi misturada com a solução aquosa (25%) fornecendo uma composição final total que compreende óleo de mostarda 0,5% e Admul T80K 2,5%.

O pH da pasta pode ser ajustado e então foi inoculado com o

coquetel de leveduras e fungos (10^4 CFU).

Os resultados são mostrados nas figura 9 e 10. Como pode ser visto, o óleo de mostarda encapsulado em micelas tem um efeito inibitório importante sobre crescimento de leveduras e fungos.

5 Exemplo 4

Um coquetel de Salmonella que compreende *Salmonella senftenberg* 775W Nº 62, *Salmonella typhimurium* Nº 52, *Salmonella heidelberg* Nº 63, *Salmonella enteritidis* Nº 53, *Salmonella infantis* Nº 54 foi usado para inocular amostras de frango.

10 A um escabeche foi adicionada uma emulsão de acordo com a invenção compreendendo óleo de orégano em diferentes níveis (ver tabela abaixo) em uma proporção de 3:1 (escabeche:emulsão).

As amostras de frango foram cobertas por escabeche e incubadas por 30 minutos. Depois de 30 minutos, a contagem de Salmonella foi executada e mostrada na figura11.

<u>Solução de óleo a 1%</u>	<u>Solução de óleo a 0,5%</u>	<u>Solução de óleo a 0,2%</u>
Admul T80K a 20%	Admul T80K a 10%	Admul T80K a 4%
Óleo de orégano a 4%	Óleo de orégano a 2%	Óleo de orégano a 0,8%
76% a água destilada	88% a água destilada	95,2% a água destilada

Os resultados na figura11 mostram que uma emulsão compreendendo óleo de orégano encapsulado em micelas é capaz de inibir o crescimento de *Salmonella* somente depois de 30 minutos.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição alimentar que compreende ingredientes nutricionais e micelas tensoativas de grau alimentício incorporando pelo menos um agente antimicrobiano.
- 5 2. Composição alimentar de acordo com a reivindicação 1, que é água, em particular, águas aromatizadas engarrafadas, molhos, escabeches, maioneses, mostardas, ketchups, cremes à base de maionese para salada, molhos para salada, sopas, frutas em conserva, produtos lácteos, carnes, peixe, vegetais, etc.
- 10 3. Composição alimentar de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que a composição alimentar é sem gordura, com baixo teor de gordura, teor médio de gordura ou até um teor de gordura de 50%.
4. Composição alimentar de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, que é livre de aditivos.
- 15 5. Composição alimentar de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, que tem um valor de pH entre 2 e 8, preferivelmente entre 3 e 7.
6. Composição alimentar de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que os ingredientes nutricionais são selecionados de carboidratos, gorduras, proteínas, fibras, minerais, vitaminas, etc. e misturas dos mesmos.
- 20 7. Composição alimentar de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o tensoativo de grau alimentício é selecionado a partir da classe de tensoativos de mono-oleato de polioxietileno sorbitano ou de fontes animais ou vegetais que têm propriedades ativas emulsificantes.
- 25 8. Composição alimentar de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o agente antimicrobiano é selecionado de eugenol, limoneno, carvacrol e/ou outros óleos essenciais.
- 30 9. Composição alimentar de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o agente antimicrobiano é selecionado de óleo de cravo, óleo baio, óleo de canela, óleo de orégano, óleo de tomilho,

óleo de cominho, óleo de endro, óleo de coentro, óleo de citros, óleo de laranja, óleo de mostarda ou qualquer combinação dos mesmos.

5 10. Composição alimentar de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o agente antimicrobiano é óleo de cravo, óleo de orégano, óleo de mostarda ou qualquer combinação dos mesmos.

11. Composição alimentar de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que o agente antimicrobiano está em uma concentração entre 0,05% e 1,5% em peso da composição alimentar.

10 12. Composição alimentar de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, que é estável durante armazenamento à temperatura ambiente ou de refrigeração.

15 13. Composição alimentar de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, que está microbiologicamente segura contra bactérias patogênicas, leveduras e fungos e estável em relação à deterioração microbiológica.

14. Composição alimentar de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, não compreendendo sal.

20 15. Composição alimentar de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que a atividade de água é mais de 0,5, preferivelmente mais de 0,7, ainda mais preferivelmente mais de 0,8.

16. Método para melhorar a segurança microbiológica e a estabilidade do alimento que compreende as etapas de:

25 a. preparação de uma emulsão que compreende micelas tensoativas de grau alimentício que incorporam pelo menos um agente antimicrobiano, e

b. incorporação da dita emulsão em uma composição alimentar.

30 17. Método de acordo com a reivindicação 16, em que a emulsão é preparada pela mistura por um tensoativo de grau alimentício em um meio aquoso a fim de formar micelas, e então adicionando o agente antimicrobiano à emulsão micelar.

18. Método de acordo com a reivindicação 17, em que a concentração de agente antimicrobiano no meio aquoso é pelo menos 0,1%,

preferivelmente até 3%.

19. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 18, em que o tensoativo de grau alimentício é selecionado a partir da classe de tensoativos de mono-oleato de polioxietileno sorbitano ou de fontes animais ou vegetais que têm propriedades emulsificantes ativas.

20. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 19, em que a emulsão é incorporada na composição alimentar em uma quantidade até 80% em peso da composição alimentar.

21. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 20, em que a composição alimentar é água, em particular águas aromatizadas engarrafadas, molhos, escabeches, maioneses, mostardas, ketchups, cremes à base de maionese para salada, molhos para salada, sopas, frutas em conserva, produtos lácteos, carnes, peixe, vegetais, etc.

22. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 21, em que o agente antimicrobiano é selecionado de óleo de cravo, óleo baio, óleo de canela, óleo de orégano, óleo de tomilho, óleo de cominho, óleo de endro, óleo de coentro, óleo de citros, óleo de laranja, óleo de mostarda ou qualquer combinação dos mesmos.

23. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 16 a 22, em que o agente antimicrobiano é óleo de cravo, óleo de orégano, óleo de mostarda ou qualquer combinação dos mesmos.

24. Uso de uma emulsão que compreende micelas tensoativas de grau alimentício que incorporam pelo menos um agente antimicrobiano na produção, armazenamento ou preparação de uma composição alimentar.

25. Uso de acordo com a reivindicação 24, em que a emulsão melhora a segurança microbiológica e a estabilidade da dita composição alimentar.

26. Uso de acordo com a reivindicação 24 ou 25, em que o agente antimicrobiano é selecionado de óleo de cravo, óleo baio, óleo de canela, óleo de orégano, óleo de tomilho, óleo de cominho, óleo de endro, óleo de coentro, óleo de citros, óleo de laranja, óleo de mostarda ou qualquer combinação dos mesmos.

27. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 26, em que o agente antimicrobiano é óleo de cravo, óleo de orégano, óleo de mostarda ou qualquer combinação dos mesmos.

5 28. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 27, para inibição da atividade de bactérias, fungos, e leveduras, tais como *Escherichia spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Listeria spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Salmonella spp.*, *Penicillium spp.*, *Saccharomyces spp.*, *Debaryomyces spp.*, *Pichia spp.*, *Mucor spp.*, *Eurotium spp.*

10 29. Uso de acordo com a reivindicação 28, em que as bactérias, fungos e leveduras são *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Lactobacillus buchneri*, *Salmonella enterica*, *Penicillium chrysogenum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia farinosa*, *Mucor plumbeus*.

15 30. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 29, em que o agente antimicrobiano é óleo de orégano e em que a emulsão é usada para inibição completa da atividade da *Salmonella spp.*

31. Uso de acordo com a reivindicação 30, em que a atividade da *Salmonella spp.* é completamente inibida dentro de 5 minutos após a emulsão entrar em contato com a dita *Salmonella spp.*

20 32. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 24 a 29, em que o agente antimicrobiano é o óleo de mostarda e em que a composição alimentar é sensível à contaminação por fungos.

33. Método para melhorar a segurança microbiológica e a estabilidade do alimento que compreende as etapas de

25 a. preparação de uma emulsão que compreende micelas tensoativas de grau alimentício incorporando pelo menos um agente antimicrobiano para melhorar ou reduzir a percepção sensorial do dito agente antimicrobiano, e

b. incorporação da dita emulsão em uma composição alimentar.

30 34. Método de acordo com a reivindicação 33, em que o agente antimicrobiano é selecionado de eugenol, limoneno, carvacrol e/ou outros óleos essenciais.

35. Método de acordo com a reivindicação 33 ou 34, em que o alimento é água, em particular águas aromatizadas engarrafadas, molhos, escabeches, maioneses, mostardas, ketchups, cremes à base de maionese para salada, molhos para salada, sopas, frutas em conserva, produtos lácteos, carnes, peixe, vegetais, etc.

36. Produto antimicrobiano seco que compreende um tensoativo de grau alimentício e um agente antimicrobiano que, sob hidratação, tem a capacidade de gerar uma emulsão de micelas incorporando o dito agente antimicrobiano.

37. Produto seco de acordo com a reivindicação 36, em que o tensoativo de grau alimentício é selecionado a partir da classe de tensoativos de mono-oleato de polioxietileno sorbitano ou fontes animais ou vegetais que têm propriedades emulsificantes ativas.

38. Produto seco de acordo com a reivindicação 36 ou 37, em que o agente antimicrobiano é selecionado de eugenol, limoneno, carvacrol e/ou outros óleos essenciais.

39. Uso de um produto como definido em qualquer uma das reivindicações 36 a 38, em uma composição alimentar seca.

40. Uso de acordo com a reivindicação 39, em que a composição alimentar seca é a sopa de pacote, leites em pó, bebidas em pó, etc.

Fig. 1

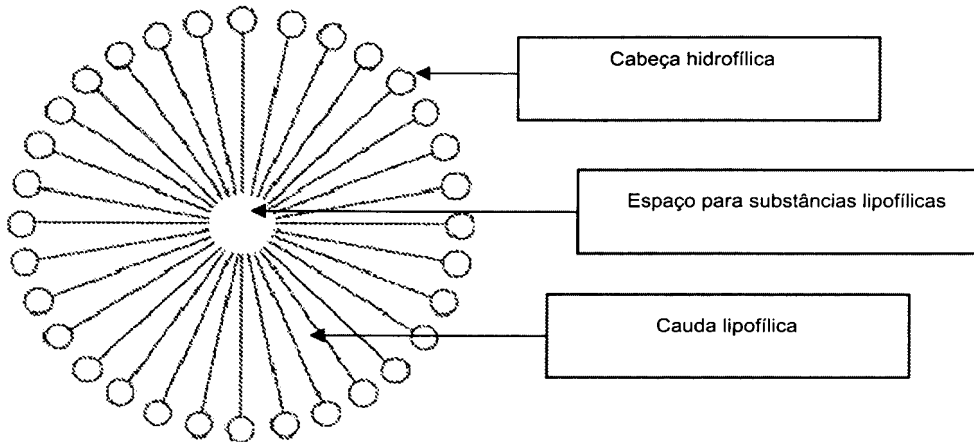


Fig. 2

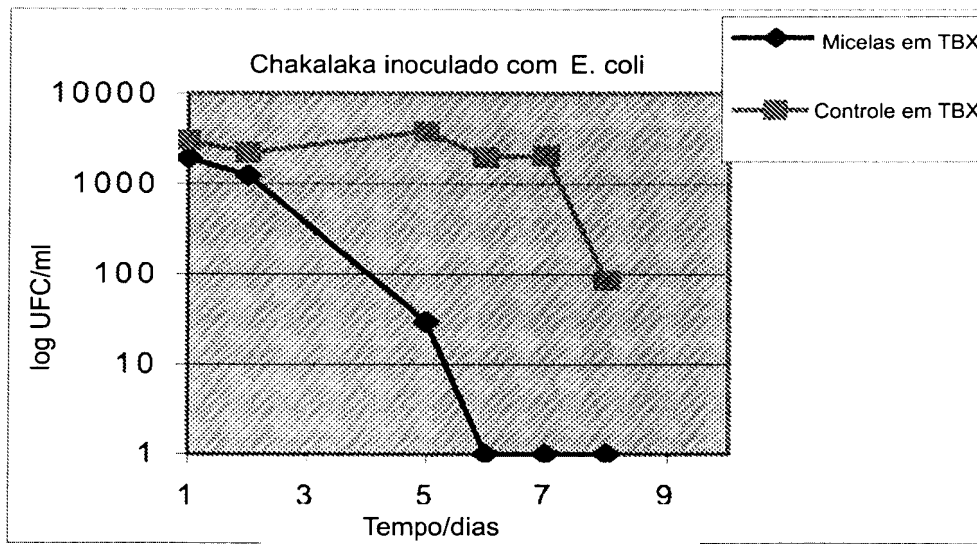


Fig. 3

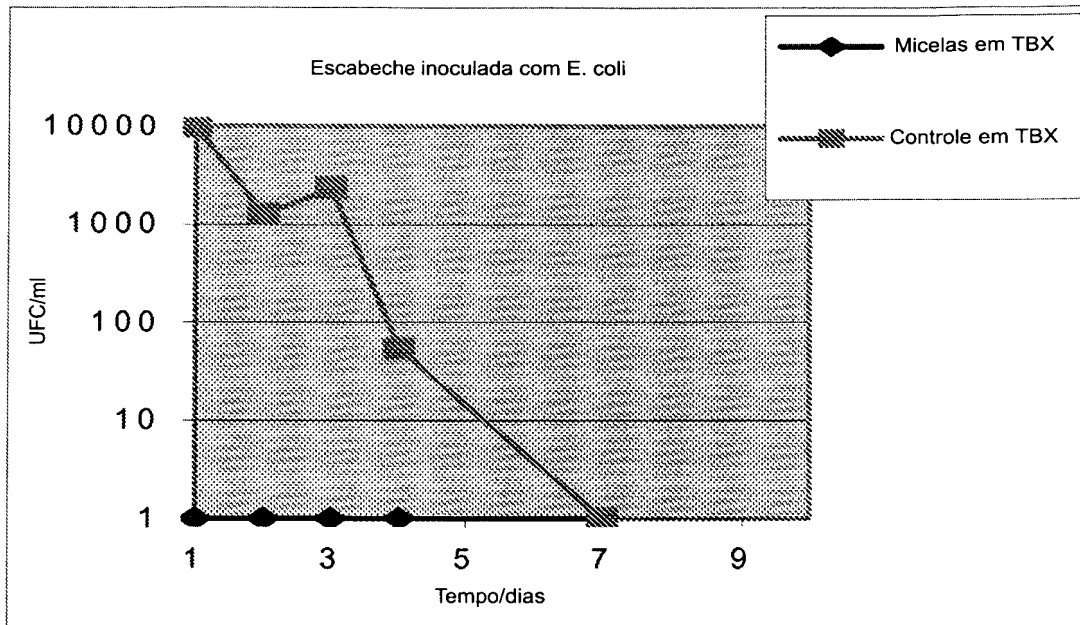


Fig. 4

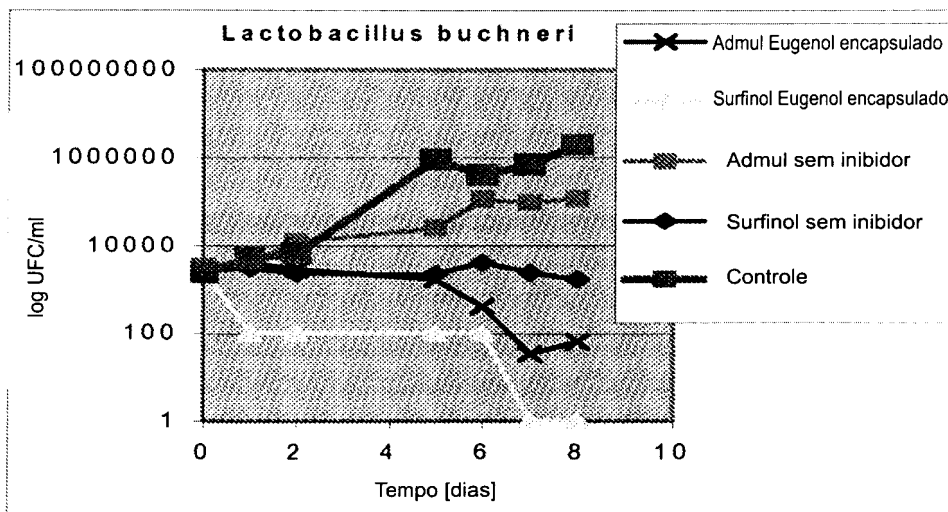


Fig. 9

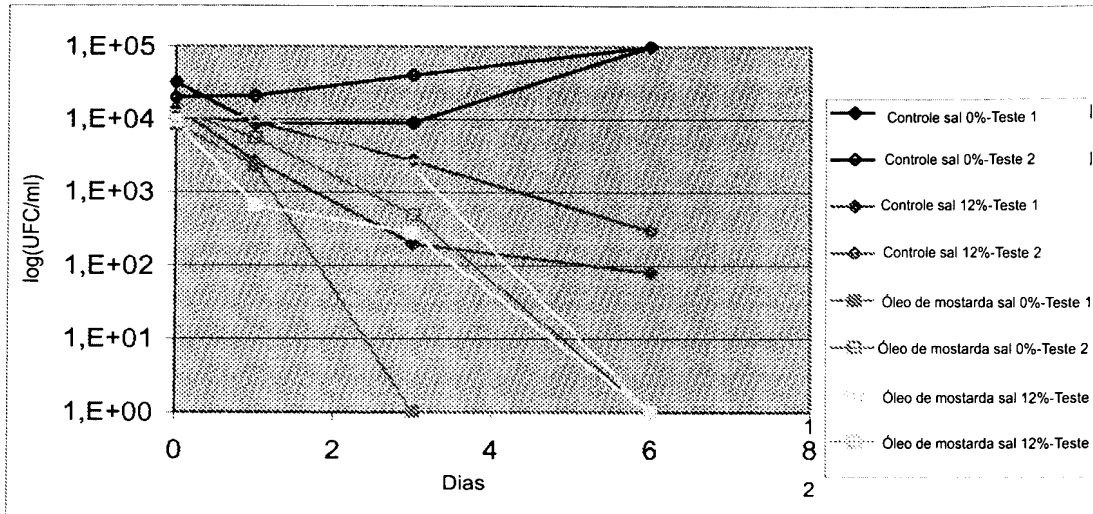


Fig. 10

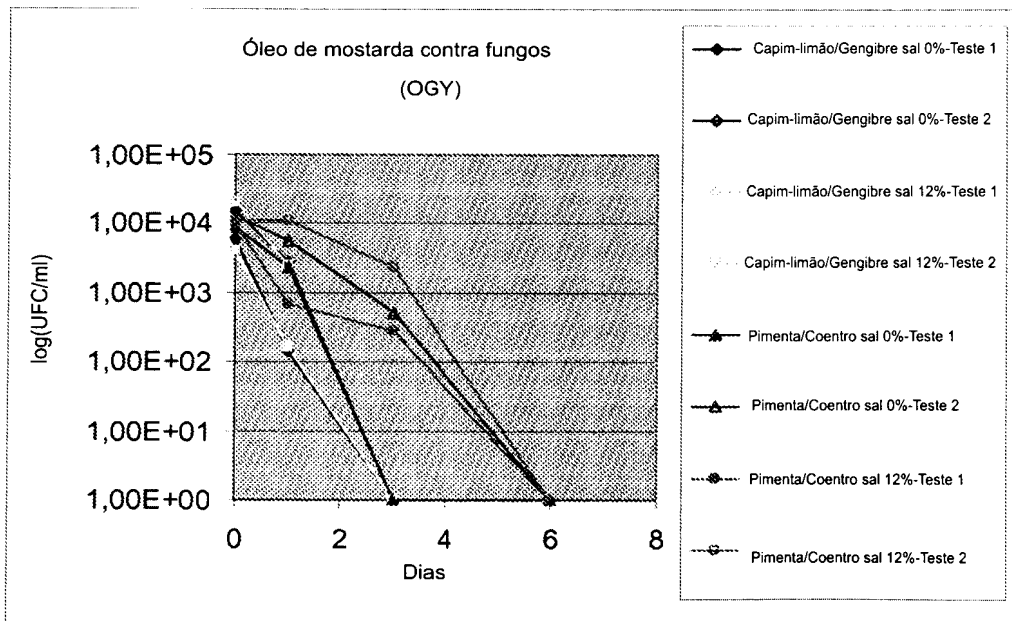
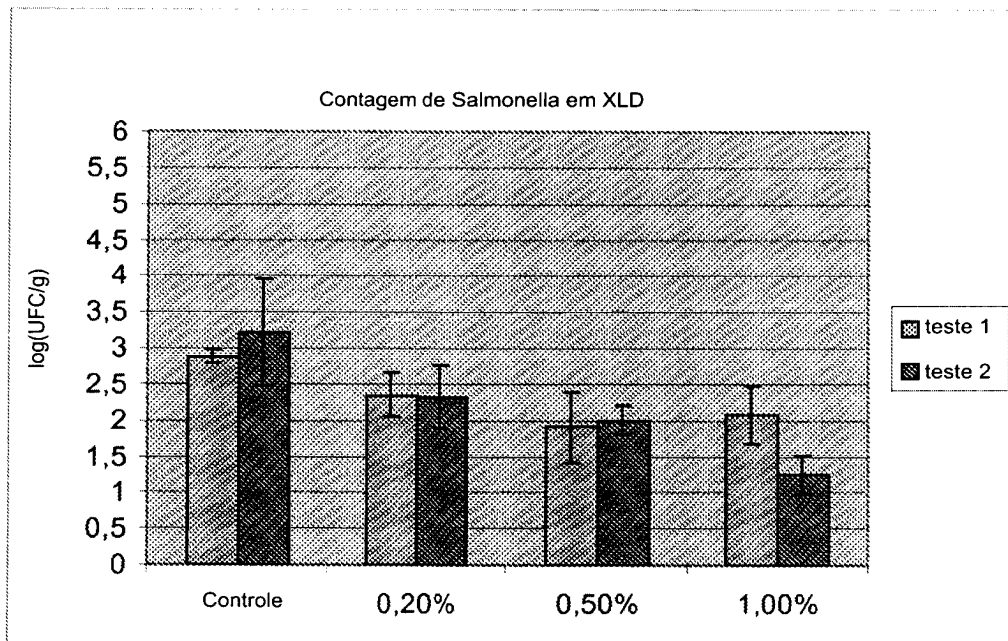


Fig. 11



-
:
.

-
:
:
:
.

RESUMO

Patente de Invenção: **"MICELAS ANTIMICROBIANAS PARA APLICAÇÕES ALIMENTARES"**.

5 A presente invenção refere-se a métodos para melhorar a segurança microbiológica e a estabilidade do alimento pelo uso de micelas de grau alimentício que encapsulam agentes antimicrobianos. A invenção também se relaciona às composições alimentares assim obtidas.