



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

**(21) PI 0722020-0 A2**



(22) Data de Depósito: 05/10/2007  
(43) Data da Publicação: 25/03/2014  
(RPI 2255)

**(51) Int.Cl.:**  
A01N 43/90  
A01N 47/44  
A01N 25/30  
A01P 1/00  
A01P 3/00  
A23C 19/11  
A23L 3/3463

**(54) Título:** COMBINAÇÕES DE FUNGICIDA DE POLIENO COM TENSOATIVOS CATIÔNICOS

**(57) Resumo:**

**(30) Prioridade Unionista:** 13/09/2007 ES P 2007 02132

**(73) Titular(es):** Laboratorios Miret, S.A.

**(72) Inventor(es):** Eva Piera Eroles, Roger Segret Pons, Sergi Figueras Roca, XAVIER ROCABAYERA BONVILA

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

**(86) Pedido Internacional:** PCT EP2007060598 de 05/10/2007

**(87) Publicação Internacional:** WO 2009/033508de 19/03/2009

## Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COMBINAÇÕES DE FUNGICIDA DE POLIENO COM TENSOATIVOS CATIÔNICOS**".

### Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a combinações de um fungicida de polieno com um tensoativo catiônico com propriedades antimicrobianas, visando melhorar a atividade conservante de ambos os compostos contra microorganismos responsáveis pela deterioração de alimentos e de produtos cosméticos e farmacêuticos.

### Antecedentes da Invenção

Na arte, é conhecido o fato de que produtos alimentícios são regularmente suscetíveis a atuarem como meio de cultura para microorganismos, constituindo um possível risco à saúde de humanos. Doenças transmitidas por alimentos continuam sendo um problema real tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, causando grande sofrimento humano e perda econômica considerável, conseqüentemente, produtos alimentícios requerem boa proteção contra a contaminação microbiana.

A natamicina, fungicida de polieno (CAS Nº 7684-93-8), também conhecida como pimaricina, é um agente antimicrobiano natural produzido pela bactéria *Streptomyces natalensis*. Esse composto é eficaz contra leveduras e hifas, porém, foi relatado que não surte efeito contra bactérias. Este agente é utilizado no setor alimentício como conservante para inibir o crescimento de fungos (aprovado na comunidade europeia sob o número E-235; nos USA, é regulado pela norma 21 CFR 172.155). Por mais de vinte anos, a natamicina tem sido utilizada para prevenir o crescimento de mofo sobre queijos e salsichas. Ademais, é utilizada também em outros gêneros alimentícios que estão sujeitos à deterioração microbiana, como temperos, molhos, escabeches, condimentos, coberturas, margarina e laticínios.

A falta de solubilidade do fungicida de polieno em vários solventes (aquosos, bem como orgânicos) restringe consideravelmente o seu uso. Devido à instabilidade do fungicida de polieno em solução, é fato conhecido ser impossível obter uma solução aquosa de fungicida à base de polieno (EP 0 678 241 B1). A solubilidade da natamicina em água é muito baixa e na or-

dem de 0,005 – 0,010% (p/p).

Por esse motivo, a natamicina tem sido aplicada a gêneros alimentícios em maneiras diferentes, por exemplo, em forma seca, em suspensões aquosas, pela mistura de natamicina com solventes miscíveis em água com intuito de ser conseguida uma solução aquosa estável, etc. O uso da forma seca implica a dificuldade em se obter uma distribuição homogênea. O uso da suspensão aquosa implica a formação de precipitados devido à baixa estabilidade da natamicina. Foram feitas várias tentativas para solubilizar fungicidas de polieno, assim como natamicina, visando melhorar a sua eficácia.

O documento EP 0 670 676 B1 refere-se a um novo tipo de preparado de natamicina que implica uma forma modificada de natamicina pelo contato da natamicina com metanol para a sua conversão em forma solvatada e, em seguida, retirada do metanol da natamicina resultante para formar  $\delta$ -natamicina. Os inventores descobriram surpreendentemente que  $\delta$ -natamicina exibe comportamento melhorado de dissolução.

O documento EP 0 678 241 B1 descreve uma suspensão aquosa de natamicina, contendo um agente espessante e com pH entre 3 – 6. Aplicando um intervalo adequado de pH, junto com agente espessante, os inventores obtiveram uma suspensão aquosa de natamicina química e microbianamente estável por mais de 14 dias, e fisicamente estável por várias horas.

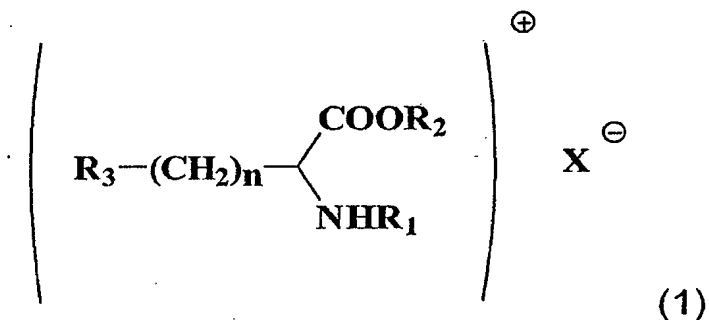
O documento US 5 597 598 refere-se a uma composição compreendendo um agente polieno antifúngico, como a natamicina, um composto antifúngico ácido e um composto ácido adicional. Esta composição é útil em prevenir o crescimento de fungos com mais resistência em fungicidas de polieno. Esta composição pode ser incluída em emulsão de revestimento ou em líquido, em que os produtos alimentícios ou agrícolas desejados a serem tratados podem ser pincelados com a emulsão de revestimento ou imersos no líquido.

O documento US 6 146 675 refere-se a uma nova composição antimicrobiana, compreendendo natamicina e um removedor (*scavenger*) de

oxigênio ou antioxidante e/ou um agente de quelação. O controle de dureza da água é utilizado para sustentar a atividade da natamicina ao impedir a sua degradação. O documento WO 2005090763 refere-se a um processo e formulação específicos para produção de comprimidos de natamicina, visando facilitar o seu preparo e uso na indústria de alimentos e rações e assegurar que estes comprimidos se desintegram rápida e completamente quando adicionados a um veículo líquido.

Por outro lado, tensoativos catiônicos são conservantes conhecidos, utilizados no setor alimentício, cosmético e farmacêutico. Tensoativos catiônicos se mostraram altamente efetivos contra a proliferação microbiana e, ao mesmo tempo, seguros para ingestão por humanos e mamíferos em geral. Por esses motivos todos, tensoativos catiônicos representam uma ferramenta atraente no setor.

Foi demonstrado que tensoativos de acordo com a fórmula (1), derivados da condensação de ácidos graxos e de aminoácidos dibásicos esterificados são substâncias altamente eficientes na proteção contra microorganismos.



Onde:

$\text{X}^-$  é um contraíon derivado de ácido inorgânico ou orgânico, de preferência,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{Cl}^-$  ou  $\text{HSO}_4^-$ ,

$\text{R}_1$ : é um alquila de cadeia reta de um ácido graxo saturado ou um hidróxi ácido com 8 a 14 átomos de carbono, unido ao grupo  $\alpha$ -amino por meio de ligação amida,

$\text{R}_2$ : é um alquila de cadeia reta ou ramificada de 1 a 18 átomos de carbono ou um grupo aromático, e



loides aniônicos é descrita em WO 03/094638, esta combinação levando à geração de produtos sólidos contendo quantidades aproximadamente estequiométricas do tensoativo catiônico e do hidrocoloide aniônico. Uma combinação adicional dos tensoativos catiônicos é descrita em (US 7 074 447 e EP 1 450 608 B1), esta combinação relacionada com sorbato de potássio, sorbato de cálcio ou ácido sórbico, que demonstrou ser altamente efetiva na conservação de alimentos. Os sistemas conservantes descritos em (US 7 074 447 e EP 1 450 608 B1) são caracterizados por sua atividade sinérgica.

Foi constatado agora que a atividade antimicrobiana das combinações de LAE e dos outros compostos definidos pela fórmula (1) acima com a maioria dos conservantes comuns iônicos e não-iônicos utilizados para proteger produtos alimentícios e também formulações e preparados cosméticos é mais alta do que a atividade exibida por cada um dos componentes quando utilizados isoladamente na mesma dose. Foi observado sinérgismo quando as quantidades dos componentes da fórmula (1) e dos outros antimicrobianos são reduzidas. Dessa forma, os efeitos tóxicos adversos e/ou irritação e/ou alergia exibidos pelas combinações dos conservantes são também reduzidos.

LAE, também conhecido como arginato láurico, é fabricado pelo Laboratorios Miret, S.A. (LAMIRSA, Espanha). O arginato láurico é listado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) como substância GRAS (Geralmente Reconhecida Como Segura), sob o código GRN 000164. O USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos) aprovou o seu uso em produtos à base de carne e de aves (Diretiva FSIS 7120.1).

Há necessidade por uma solução aquosa estável de fungicidas de polieno que melhore a sua distribuição homogênea ao ser aplicada com a finalidade de tratar produtos alimentícios ou dispositivos empregados para preparar produtos alimentícios, dispositivos médicos ou produtos cosméticos ou médicos onde o crescimento de microorganismos é comum.

Há necessidade também de um processo para o preparo de uma solução aquosa de fungicidas de polieno, efetivo e fácil e que permita prepa-

rar soluções em qualquer concentração adequada.

### Sumário da invenção

5 A invenção provê uma composição sólida compreendendo pelo menos um fungicida de polieno e pelo menos um tensoativo catiônico derivado da condensação de ácidos graxos e aminoácidos dibásicos esterificados.

A invenção provê também um método para preparar a dispersão de fungicida de polieno pela dispersão da composição sólida, de acordo com a invenção, em meio a um líquido adequado.

10 A invenção provê ainda uma dispersão de fungicida de polieno preparada pelo método da invenção.

Adicionalmente, a invenção provê um método para preparar uma solução aquosa do fungicida de polieno pela diluição da dispersão com água.

15 Esta invenção soluciona a questão relativa à solubilidade geralmente baixa do fungicida de polieno ao prover uma composição aquosa constituída por um tensoativo catiônico da fórmula (1) que encapsula um fungicida de polieno como a natamicina. Esta composição melhora surpreendentemente a atividade do fungicida de polieno ao aumentar a sua biodisponibilidade na fase aquosa, sendo esta o meio onde crescem os microorganismos. O encapsulamento de um fungicida de polieno em tensoativo catiônico é uma maneira de evitar que este se precipite. Ao mesmo tempo, melhora a sua disponibilidade na matriz onde a solução aquosa é aplicada. Inesperadamente, uma vez encapsulado pelo tensoativo catiônico na solução aquosa, o fungicida de polieno é liberado para a matriz, onde a solução aquosa é aplicada, em nível de dose sempre solubilizada, estável e muito mais efetiva.

20  
25  
30 Fungicidas de polieno têm em geral efeito contra leveduras e hifas, e não contra bactérias. Tensoativos catiônicos, devido às suas propriedades catiônicas, ligam-se facilmente às membranas de bactérias. Os inventores observaram inesperadamente que, após encapsulamento de um fungicida de polieno em um tensoativo catiônico em solução aquosa, é ob-

servado um efeito sinérgico antimicrobiano.

O encapsulamento de fungicidas de polieno em tensoativos catiônicos dá origem a uma solução aquosa estável e efetiva contra leveduras, fungos e bactérias, sendo surpreendentemente observado um efeito sinérgico.

#### Descrição de concretizações preferidas

Os presentes inventores descobriram que é possível prover uma composição sólida constituída essencialmente pelo fungicida de polieno e o tensoativo catiônico da fórmula (1) acima.

O tensoativo catiônico utilizado na presente invenção é derivado da condensação de ácidos graxos e aminoácidos dibásicos esterificados, tendo a fórmula (1) acima, a espécie mais preferida dos tensoativos catiônicos da fórmula (1) sendo o éster etílico de arginato láurico da fórmula (2) acima (doravante referido como LAE).

O segundo componente da composição sólida é o fungicida de polieno. Diferentes fungicidas de polieno podem ser utilizados no contexto da presente invenção, tais como natamicina, lucensomicina, nistatina e anfotericina B, porém o tipo mais amplamente utilizado de fungicida de polieno é natamicina, e este é também o tipo preferido de fungicida de polieno na composição sólida da invenção.

A composição sólida pode conter componentes adicionais, assim como açúcar, sal, agentes aglomerantes, antioxidantes, agentes de quelação, agentes tensoativos e agentes espessantes. Tais componentes adicionais podem atuar para estabilizar a própria composição sólida, por exemplo, a presença de antioxidante pode ajudar a prolongar a estabilidade no armazenamento da composição sólida. Os componentes adicionais podem atuar para melhorar a forma dispersada da composição sólida ou sua solução mais diluída em água, sendo esta forma dispersada e a solução, as formas processadas preferidas da composição sólida, as quais serão discutidas abaixo.

A presença dos componentes adicionais pode ajudar a preparar a forma dispersada do fungicida de polieno por simples dispersão em sol-

vente, sem a necessidade de adicionar qualquer suplemento posterior.

Na mesma maneira, a presença dos componentes adicionais pode ajudar a preparar a solução aquosa do fungicida de polieno, sem a necessidade de prover qualquer solução em particular para o preparo da solução, apenas a própria água pode ser suficiente para atingir o efeito desejado.

A composição sólida consiste essencialmente do fungicida de polieno e do tensoativo catiônico da fórmula (1) acima. Em sua concretização mais preferida, a composição sólida consiste de natamicina e LAE.

A quantidade dos dois componentes, do fungicida de polieno e do tensoativo catiônico, pode variar na dependência do uso pretendido. Pode ser apropriado prover uma composição sólida com quantidade relativamente maior do fungicida de polieno, ou uma composição sólida com quantidade relativamente maior do tensoativo catiônico.

O preparo da dispersão do fungicida de polieno, o qual será descrito abaixo, envolve a etapa de simples dispersão em solvente adequado.

O preparo da solução do fungicida de polieno envolve a diluição posterior da dispersão com água ou a dissolução da composição sólida em água.

Em qualquer um destes preparos, não há intenção de ser feita uma adição a mais do fungicida de polieno ou do tensoativo catiônico. Desse modo, as quantidades finais relativas do fungicida de polieno e do tensoativo catiônico, na dispersão e na solução, já são determinadas por sua presença relativa na composição sólida inicialmente provida. No tratamento posterior da composição sólida, através do método de dispersão ou de solução, mais fungicida de polieno ou o tensoativo catiônico poderia ainda ser adicionado na prática, porém, essa outra adição complicaria necessariamente o método de preparo e não se constitui o método preferido da invenção.

A mistura do tensoativo catiônico com o fungicida de polieno pode se consistir em 2,0 – 99,9% em peso do tensoativo catiônico e em 0,1 – 98,0% em peso do fungicida de polieno, o total dos dois sendo 100%.

As misturas preferidas do tensoativo catiônico com o fungicida de polieno cobrem um amplo intervalo de misturas, uma vez que cada intervalo possui um efeito específico.

Por exemplo, a mistura constituída por 99,0% de tensoativo catiônico e por 1,0% de fungicida de polieno é preferida para o uso naqueles gêneros alimentícios, nos quais a presença inicial de microorganismos, como leveduras e fungos, é em baixa concentração. A mistura possibilita efeito constante do fungicida de polieno contra os microorganismos.

Outra mistura preferida é destinada para cura de produtos alimentícios, pela qual o processo de cura é breve, porém a concentração inicial de leveduras e hifas é muito alta. A mistura preferida é constituída por 2% de tensoativo catiônico e 98% de fungicida de polieno. Por causa desta mistura, a alta concentração de leveduras e hifas, no início do processo de cura, é reduzida consideravelmente, evitando, nesse sentido, o ataque inicial desses microorganismos ao alimento.

Há outra mistura preferida caracterizada pela relação de 1:1 entre o tensoativo catiônico e o fungicida de polieno. Esta mistura é preferida naqueles produtos submetidos a um processo breve de cura, quando a concentração inicial de microorganismos é baixa, ou a um processo longo de cura quando a concentração de microorganismos é alta.

A composição pode compreender ainda uma quantidade de outros ingredientes, conforme discutido acima. A quantidade dos outros ingredientes depende do uso final pretendido da dispersão sólida. Uma quantidade habitual dos outros ingredientes pode ser no intervalo de 0 a 5 partes, em peso, para um total de 100 partes em peso da mistura do fungicida de polieno com o tensoativo catiônico.

A composição sólida pode ser preparada empregando métodos convencionais de preparo. Um método conveniente é introduzir os dois componentes, o tensoativo catiônico e o fungicida de polieno, em um misturador de sólidos e misturar os componentes no misturador por tempo suficiente até ser obtida uma mistura homogênea. Se pretendida a presença de ingredientes adicionais, estes podem ser adicionados juntos com os componentes,

tensoativo catiônico e fungicida de polieno, ou podem ser adicionados após ter sido obtida a mistura homogênea. A composição finalmente obtida é uma substância em pó.

5 A composição sólida pode ser armazenada por duração considerável de tempo sem necessidade de adotar medidas específicas de cautela. É geralmente recomendado armazenar as composições sólidas sob condições de baixa umidade e temperatura abaixo de 20°C, porém condições fora do intervalo preferido também permitem o armazenamento por duração prolongada.

10 A composição sólida da invenção é especialmente adequada para uso no preparo de uma dispersão do fungicida de polieno em qualquer líquido adequado. A dispersão pretende referir-se a um líquido compreendendo partículas com tamanho de 50 µm a 10 nm. A dispersão pode exibir certo turvamento, o qual pode ser tão intenso a ponto de fornecer aspecto  
15 leitoso. O aspecto final da dispersão é determinado pelo tamanho e a concentração das partículas no líquido dispersante. A dispersão pode ser considerada como preparado concentrado do fungicida de polieno, a concentração sendo bem acima do intervalo no qual o fungicida de polieno seria utilizado como agente antimicrobiano em produtos alimentícios.

20 A base líquida da dispersão pode ser qualquer líquido adequado para uso no preparo de alimentos. Estes líquidos são água, propileno glicol, etanol ou glicerina. Misturas destes líquidos são possíveis também.

Água pode referir-se a água corrente, água desmineralizada, água destilada ou soluções de qualquer sal em água.

25 Água corrente é especialmente preferida.

A fase dispersada na dispersão é constituída essencialmente pelo tensoativo catiônico e o fungicida de polieno. Pode conter também os ingredientes adicionais, se estes estiverem presentes. Alternativamente, os ingredientes adicionais podem ter sido dissolvidos no líquido a ser utilizado  
30 para o preparo da dispersão.

O preparo da dispersão é especialmente fácil. O líquido selecionado para a etapa de dispersão é adicionado à composição sólida, ou a

composição sólida é adicionada ao líquido. A mistura é agitada, em seguida, por tempo suficiente que resulte na dispersão desejada. Nenhum material particulado restante pode ser observado. O grau desejado de dispersão pode ser controlado pelos métodos convencionais como, por exemplo, turbidimetria.

A concentração do fungicida de polieno na dispersão pode variar entre 100 ppm e 5000 ppm. A concentração correspondente do tensoativo catiônico na dispersão depende da presença relativa dos dois componentes na dispersão sólida.

Uma das características surpreendentes da presente invenção é a de que a dispersão do fungicida de polieno exibe alto grau de estabilidade. A dispersão pode ser armazenada por mais de 12 meses sem que seja observada precipitação e sem perda de quaisquer de suas características ópticas originais, uma dispersão que, em princípio, é levemente turva assim o permanecerá após 12 meses. A dispersão deve ser armazenada em recipientes fechados, porém, fora isso, não necessita de tratamento especial durante o armazenamento.

A vantagem especial da dispersão da invenção do fungicida de polieno é a desta ser a base altamente adequada para o preparo subsequente de uma solução do fungicida de polieno em água. A solução do fungicida de polieno em água é o preparado que se constitui o mais ideal para o tratamento de produtos alimentícios. O uso típico de natamicina é o tratamento de queijo. É muito apropriada para preparar um banho adequado no qual se permite que os queijos flutuem por um período de tempo específico até que o efeito desejado tenha sido estabelecido. A invenção, portanto, provê o método de preparo de uma solução do fungicida de polieno pela diluição da dispersão do fungicida de polieno, descrita acima, com água. Este preparo é especialmente fácil e conveniente. A dispersão de acordo com a invenção é adicionada ao recipiente contendo água, ou alternativamente água é adicionada a um recipiente já contendo a dispersão. A mistura deve ser misturada até ser obtida uma solução homogênea. A duração da etapa de agitação não é especialmente longa, sendo realizada com um dispositivo

convencional para agitação por 10 a 20 minutos, tempo geralmente suficiente para obter a solução homogênea.

5 A solução obtida é transparente e, geralmente, nenhum precipitado pode ser observado e nenhum turvamento é aceito. No entanto, em algumas ocasiões, certo grau de turvamento ou um leve precipitado pode aparecer, o que, em todos os casos, é completamente aceitável uma vez que é consideravelmente mais baixo do que em uma amostra com apenas natamicina.

10 É possível também preparar a solução pelo processamento da composição sólida em volume correspondente de água imediatamente e, de acordo com o mesmo, omitir a etapa do armazenamento separado como dispersão. Esse processo é geralmente menos conveniente do que o preparo da solução com base na dispersão, podendo ser necessária intensa agitação por tempo considerável para alcançar o resultado desejado, e o controle do resultado final é menos fácil, comparado com a diluição da dispersão.

20 E, evidentemente, é possível preparar a solução aquosa a partir dos próprios componentes, fungicida de polieno e o tensoativo catiônico, adicionando estes componentes a uma quantidade adequada de água e agitando até a homogeneidade. Nessa maneira de preparo, é preferido que o tensoativo catiônico seja inicialmente adicionado à fase líquida e que o fungicida de polieno seja adicionado na segunda etapa. A maneira de preparo é menos conveniente e envolve energia considerável para agitação, porém, é possível e pode levar ao mesmo resultado final.

25 A estabilidade da solução é alta. O preparo de uma solução pela diluição da dispersão demonstrou que a solução permanece estável por 6 meses. Portanto, a solução pode ser preparada imediatamente, porém, o preparo intermediário da dispersão mais concentrada pode geralmente superar muitas dificuldades práticas do armazenamento.

30 A concentração final dos componentes, fungicida de polieno e o tensoativo catiônico, na solução aquosa é determinada pela concentração destes componentes no preparado a partir do qual a solução aquosa é pre-

parada.

A mistura de natamicina (comercialmente disponível) com um tensoativo catiônico, como LAE, solubilizou a natamicina em uma solução aquosa. De acordo com o nível da dose entre natamicina e LAE, a solubilidade total de natamicina foi observada. A solução aquosa obtida exibia baixa viscosidade, já que não é preciso adicionar gomas ou outras substâncias espessantes na solução para estabilizar a natamicina. Esta baixa viscosidade melhora o processo de aplicação da solução no produto desejado a ser tratado.

A tabela a seguir apresenta a relação entre natamicina e LAE para que seja atingida a estabilidade de natamicina em solução aquosa:

Natamicina (PPM)	LAE (PPM)	Relação	Status da solução aquosa
100	3.000	1:30	Leve precipitado
100	5.000	1:50	Solubilidade
100	50.000	1:500	Solubilidade
250	10.000	1:40	Leve precipitado
250	20.000	1:80	Solubilidade
500	30.000	1:60	Leve precipitado
500	45.000	1:90	Solubilidade
1.000	100.000	1:100	Solubilidade

Os resultados revelam que natamicina foi solubilizada melhor quando misturada com as doses mais altas de LAE. A solubilidade de natamicina depende da concentração. Uma alta concentração de natamicina implica em alta concentração de LAE para solubilizar a natamicina.

Os inventores observaram que 10% de LAE em água permitiram solubilizar mais de 1000 ppm de natamicina.

Um efeito adicional surpreendente observado na presente invenção é o de a combinação do fungicida de polieno com o tensoativo catiônico exibe um efeito biológico melhor do que poderia ser esperado com base no conhecimento dos efeitos exibidos pelos componentes isolados.

A solução da combinação de natamicina com LAE é adequada

para o tratamento de produtos alimentícios. Todos os tipos de produtos alimentícios que são tratados com natamicina podem ser tratados com a combinação da presente invenção.

Os produtos alimentícios que podem ser tratados incluem produtos tais como queijo, produtos à base de carne, especialmente produtos frios à base de carne e laticínios. A aplicação do líquido aquoso é realizada por imersão ou pulverização, a escolha do método de aplicação dependendo do tipo de produto a ser tratado.

Produtos adicionais a serem tratados podem ser líquidos para bebidas. Nesse caso, a aplicação é concluída pela adição da composição da invenção às bebidas, assim como suco de laranja.

Outras aplicações podem referir-se a produtos não destinados ao consumo. Por exemplo, produtos cosméticos podem ser tratados por pulverização com a solução aquosa ou por adição da composição da invenção diretamente ao produto.

E finalmente, cada um dos produtos da invenção, a composição sólida, a dispersão e a solução aquosa podem ser utilizadas para o preparo de preparados farmacêuticos para o tratamento de seres humanos ou de animais, o tratamento sendo direcionado a qualquer tipo de doença associada a infecções por bactérias ou fungos.

Exemplos

Exemplo 1.

198 g de LAE (fabricante: LAMIRSA) são introduzidos em um misturador de sólidos (fabricante: ORTOALRESA). Uma quantidade de 2 g de natamicina (fabricante: Sigma) é adicionada. A mistura dos dois componentes é misturada no misturador de sólidos a 60 rpm por 30 minutos.

Exemplo 2.

196 g natamicina (fabricante: Sigma) são introduzidos em um misturador de sólidos (fabricante: ORTOALRESA). Uma quantidade de 4 g de LAE (fabricante: LAMIRSA) é adicionada. A mistura dos dois componentes é misturada no misturador de sólidos a 60 rpm por 30 minutos.

Exemplo 3.

100 g de LAE (fabricante: LAMIRSA) são introduzidos em um misturador de sólidos (fabricante: ORTOALRESA). Uma quantidade de 100 g de natamicina (fabricante: Sigma) é adicionada. A mistura dos dois componentes é misturada no misturador de sólidos a 60 rpm por 30 minutos.

5 Exemplo 4.

400 g de uma mistura de acordo com o exemplo 1 são fornecidos em um recipiente. 600 ml de água corrente são adicionados ao recipiente. A mistura é agitada por 30 minutos com um agitador (produzido pela HEIDOLPH), em temperatura ambiente. Ao final do procedimento de agitação, um líquido não-transparente de cor branca foi obtido. A concentração de LAE na dispersão foi de 39,6% em peso (p/p). A concentração de natamicina na dispersão foi de 0,4% em peso (p/p). Ambas as concentrações foram determinadas por HPLC.

Exemplo 5.

15 200 g de uma mistura de acordo com o exemplo 2 são fornecidos em um recipiente. 800 ml de água corrente são adicionados ao recipiente. A mistura é agitada por 30 minutos com um agitador (produzido pela HEIDOLPH), em temperatura ambiente. Ao final do procedimento de agitação, um líquido não-transparente de cor branca foi obtido. A concentração de natamicina na dispersão foi de 19,6% em peso (p/p). A concentração de LAE na dispersão foi de 0,4% em peso (p/p). Ambas as concentrações foram determinadas por HPLC.

Exemplo 6.

25 200 g de uma mistura de acordo com o exemplo 2 são fornecidos em um recipiente. 800 ml de água corrente são adicionados ao recipiente. A mistura é agitada por 30 minutos com um agitador (produzido pela HEIDOLPH), em temperatura ambiente. Ao final do procedimento de agitação, um líquido não-transparente de cor branca foi obtido. A concentração de LAE na dispersão foi de 10,0% em peso (p/p). A concentração de natamicina na dispersão foi de 10,0% em peso (p/p). Ambas as concentrações foram determinadas por HPLC.

Exemplo 7.

Uma solução aquosa de natamicina é preparada pela adição de 1000 g da dispersão do exemplo 4 a 1000 g de água corrente. O líquido resultante foi agitado por 30 minutos. A solução obtida era transparente, com cor muito levemente esbranquiçada. A concentração de LAE na solução foi de 19,8% em peso (p/p). A concentração de natamicina na solução foi de 0,2% (p/p). A solução que foi obtida foi utilizada para o tratamento de queijo fresco.

#### Exemplo 8.

Uma solução aquosa de natamicina é preparada pela adição de 10 g da dispersão do exemplo 5 a 970 g de água corrente. O líquido resultante foi agitado por 30 minutos. A solução obtida era transparente, com cor muito levemente esbranquiçada. A concentração de natamicina na solução foi de 0,2% em peso (p/p). A concentração de LAE na solução foi de 0,004% (p/p). A solução que foi obtida foi utilizada para o tratamento de queijo curado.

#### Exemplo 9.

Uma solução aquosa de natamicina é preparada pela adição de 10 g da dispersão do exemplo 6 a 490 g de água corrente. O líquido resultante foi agitado por 30 minutos. A solução obtida era transparente. A concentração de LAE na solução foi de 0,2% em peso (p/p). A concentração de natamicina na solução foi de 0,2% (p/p). A solução que foi obtida foi utilizada para o tratamento de queijo semicurado.

#### Exemplo 10.

Queijo curado foi adquirido de um produtor local. O queijo contém leite de vaca, leite de ovelha, leite de cabra, fermentos lácticos, sal, coelho. A quantidade mínima de gordura é de 55%/peso seco. Mínimo, 45 de peso seco.

Arginato láurico – da LAMIRSA com 90% de pureza, Etil-N<sup>o</sup>-lauroil-L-arginato HCl.

Natamicina – 95% em peso seco, comercialmente disponível.

O inóculo é mistura de *Penicillium casicolum*, *Rizopus*, *Aspergillus niger* e *Cladosporium cladosporioides*. Esporos semeados em Agar de

Sabouraud com Cloranfenicol são incubados a 25°C por 5 dias. Os esporos são raspados do Agar com caldo de Ringer e diluídos em caldo Infusão de Cérebro e Coração. O caldo Infusão de Cérebro e Coração é incubado a 25°C por 5 dias. Inóculos diluídos são misturados na concentração desejada a fim de serem obtidos inóculos mistos.

A fim de preparar o banho de natamicina com arginato láurico, o LAE foi inicialmente diluído com água deionizada, uma vez este dissolvido, natamicina foi introduzida e o líquido foi deixado sob agitação durante 30 minutos pelo menos.

O queijo foi fatiado e cortado em porções iguais de 5 centímetros de diâmetro por 5 milímetros de largura em meio estéril.

As porções de queijo foram imersas no banho por 5 segundos. Foi deixado que gotejassem e secassem por 5 minutos em uma superfície estéril. Em seguida, cada amostra foi inoculada com *Penicillium casicolum*, *Rizopus*, *Aspergillus niger* e *Cladosporium cladosporioides* em concentração alvo de 4 log CFU/g.

#### Tratamentos

Concentrações de 95% de natamicina: dois banhos com concentrações diferentes de natamicina foram preparados: 500 ppm e 1000 ppm.

Concentrações de arginato láurico: quatro banhos com concentrações diferentes de arginato láurico foram preparados: 0,5%, 1%, 5% e 10%.

Concentrações de arginato láurico com natamicina a 95%: banhos mistos de diferentes concentrações de arginato láurico e natamicina foram preparados.

Todos os tratamentos foram comparados com um controle não tratado e entre si.

1. Controle

2. 500 ppm de natamicina

3. 1000 ppm de natamicina

4. 0,5% de LAE

5. 1% de LAE

- 6. 5% de LAE
- 7. 10% de LAE
- 8. 500 ppm de natamicina + 0,5% de LAE
- 9. 500 ppm de natamicina + 5% de LAE

5                      Temperatura de armazenamento: as amostras foram mantidas a 22°C.

Análise: determinação do efeito microbicida de amostras tratadas com arginato láurico e natamicina contra *Penicillium casicolum*, *Rizopus*, *Aspergillus niger* e *Cladosporium cladosporioides*. A análise (Agar Rosa de Bengala, 25°C, 5 dias) foi realizada inicialmente em 5 dias, em 10 dias e em 15 dias em três repetições. Todos os efeitos microbicidas foram comparados com o tratamento separado com natamicina e arginato láurico isolados.

15                      O primeiro gráfico (figura 1) mostra o poder inibidor do tratamento separado de arginato láurico e natamicina, o melhor tratamento é arginato láurico a 10%.

O segundo gráfico (figura 2) mostra os efeitos de sinergia entre arginato láurico e natamicina, a mistura de LAE a 5% e natamicina, 500 ppm, é melhor do que arginato láurico a 10%.

20                      O terceiro gráfico (figura 3) mostra também os efeitos de sinergia entre arginato láurico e natamicina, a mistura de arginato láurico a 0,5% e natamicina, 500 ppm, é similar aos efeitos da natamicina, 1000 ppm.

#### Conclusão

25                      Após a análise dos dados coletados do estudo, foi concluído que o tratamento com arginato láurico a 10% é eficaz contra o crescimento natural de microorganismos no queijo, porém a mistura entre o arginato láurico a 5% e a natamicina, 500 ppm, é a melhor com concentração menor de arginato láurico, portanto, a sinergia é evidente.

#### Exemplo 11.

30                      Neste exemplo, a influência do sinergismo de combinações de LAE e natamicina, na composição da invenção, foi investigada.

Com essa finalidade, soluções de propilenoglicol com concentrações diferentes de LAE e natamicina foram preparadas.

LAE foi produzido pela LAMIRSA, Terrassa; Natamicina foi adquirida da SIGMA.

Os efeitos desses preparados foram investigados contra os fungos *Aspergillus niger*, *Penicillium caseicolum*, *Cladosporium cladosporioides* e *Rhizopus*, as bactérias *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) e as leveduras *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763).

Nas tabelas 1 a 10 a seguir, o efeito de LAE e natamicina é exibido quando administrados isoladamente ou em combinação. As tabelas indicam os valores de MIC encontrado em diferentes relações entre natamicina e LAE, pelo qual, um valor para natamicina:LAE de 1:1 significa a mesma concentração para ambas as substâncias na composição antimicrobiana.

A interação dos dois componentes da mistura antimicrobiana é calculada de acordo o método descrito por Kull *et al.* (Kull F.C., Eisman P.C., Sylwestrowicz H.D. e Mayer R.L., *Applied Microbiology*, 1961; 6:538-541). Segundo este método, o assim chamado índice de sinergia é calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Índice de Sinergia SI} = Q_{\text{lae}}/Q_{\text{LAE}} + Q_n/Q_N$$

Os elementos utilizados para o cálculo do índice de sinergia de acordo com a fórmula acima possuem o seguinte significado:

$Q_{\text{lae}}$  = concentração inibidora mínima de LAE na mistura de LAE e natamicina,

$Q_{\text{LAE}}$  = concentração inibidora mínima de LAE como único antimicrobiano sem natamicina,

$Q_n$  = concentração inibidora mínima de natamicina na mistura de LAE e natamicina e

$Q_N$  = concentração inibidora mínima de natamicina como único antimicrobiano sem LAE.

Todos os símbolos assinalados indicam uma concentração específica que leva a um ponto final específico, nesse caso, a inibição de crescimento dos micro-organismos, de modo que o ponto final selecionado é, de

fato, a concentração inibidora mínima (MIC).

O método de Kull *et al.* para o cálculo do índice de sinergia permite uma avaliação muito rápida do tipo de interação exibida pelos dois componentes da mistura antimicrobiana. Quando o índice de sinergia exibe um valor acima de 1, então, há um antagonismo entre os dois componentes. Quando o índice de sinergia é 1, então, há adição dos efeitos dos dois componentes. Quando o índice de sinergia exibe valor inferior a 1, então, há sinergismo entre os dois componentes.

Valores de sinergia da solução de LAE e natamicina

10 Terminologia:

$Q_n$ : MIC de natamicina na mistura de natamicina e LAE

$Q_N$ : MIC de natamicina isolada

$Q_{lae}$ : MIC de LAE na mistura de natamicina e LAE

$Q_{LAE}$ : MIC de LAE isolado

15 SI: Índice de Sinergia

Os valores de MIC de natamicina isolada ( $Q_N$ ), relatados nas Tabelas 5 a 8, correspondem ao valor máximo estudado. No entanto, a MIC real de natamicina é mais alta do que os valores máximos estudados (isto é, 1024, 2048), conseqüentemente, o SI real deve ser mais baixo do que o SI relatado nas tabelas.

20

Tabela 1.

*Aspergillus niger*

Relação natamicina:LAE	$Q_n$	$Q_{lae}$	$Q_N$	$Q_n/Q_N$	$Q_{LAE}$	$Q_{lae}/Q_{LAE}$	SI
1:1	1	1	2	0,5	128	0,0078	0,508
1:5	1	5	2	0,5	128	0,0391	0,539
1:10	1	10	2	0,5	128	0,0781	0,578
1:100	0,5	50	2	0,25	128	0,3906	0,641
1:500	0,1	50	2	0,05	128	0,3906	0,441

Tabela 2.

*Penicillium caseicolum*

Relação na-tamicina:LAE	$Q_n$	$Q_{iae}$	$Q_N$	$Q_n/Q_N$	$Q_{LAE}$	$Q_{iae}/Q_{LAE}$	SI
1:1	0,5	0,5	1	0,5	256	0,0020	0,502
1:5	0,5	2,5	1	0,5	256	0,0098	0,510
1:10	0,5	5	1	0,5	256	0,0195	0,520
1:100	0,5	50	1	0,5	256	0,1953	0,695
1:500	0,25	125	1	0,25	256	0,4883	0,738

Tabela 3.

*Cladosporium cladosporioides*

Relação na-tamicina:LAE	$Q_n$	$Q_{iae}$	$Q_N$	$Q_n/Q_N$	$Q_{LAE}$	$Q_{iae}/Q_{LAE}$	SI
1:1	0,5	0,5	1	0,5	65	0,0078	0,508
1:5	0,5	2,5	1	0,5	64	0,0391	0,539
1:10	0,5	2,5	1	0,5	64	0,0391	0,539
1:100	0,25	25	1	0,25	64	0,3906	0,641
1:500	0,1	50	1	0,1	64	0,7813	0,881

5 Tabela 4.

*Rhizopus*

Relação na-tamicina:LAE	$Q_n$	$Q_{iae}$	$Q_N$	$Q_n/Q_N$	$Q_{LAE}$	$Q_{iae}/Q_{LAE}$	SI
1:1	3	3	4	0,75	648	0,0046	0,755
1:5	3	12	4	0,75	648	0,0185	0,769
1:10	3	30	4	0,75	648	0,0463	0,796
1:100	2	200	4	0,50	648	0,3086	0,809
1:500	0,5	250	4	0,13	648	0,3858	0,511

Tabela 5.

*Escherichia coli* ATCC 8739

Relação na-tamicina:LAE	$Q_n$	$Q_{iae}$	$Q_N$	$Q_n/Q_N$	$Q_{LAE}$	$Q_{iae}/Q_{LAE}$	SI
1:1	22	22	1024	2,15E-02	32	0,6875	0,709
1:5	5	25	1024	4,88E-03	32	0,7813	0,786
1:10	2	20	1024	1,95E-03	32	0,6250	0,627
1:100	0,25	25	1024	2,44E-04	32	0,7813	0,781

Relação na-tamicina:LAE	$Q_n$	$Q_{lae}$	$Q_N$	$Q_n/Q_N$	$Q_{LAE}$	$Q_{lae}/Q_{LAE}$	SI
1:500	0,05	25	1024	4,88E-05	32	0,7813	0,781

Tabela 6.

*Salmonella typhimurium* ATCC 14028

Relação na-tamicina:LAE	$Q_n$	$Q_{lae}$	$Q_N$	$Q_n/Q_N$	$Q_{LAE}$	$Q_{lae}/Q_{LAE}$	SI
1:1	21	21	2048	1,032E-02	32	0,6563	0,667
1:5	5	25	2048	2,44E-03	32	0,7813	0,784
1:10	2	20	2048	9,77E-04	32	0,6250	0,626
1:100	0,25	25	2048	1,22E-04	32	0,7813	0,781
1:500	0,05	25	2048	2,44E-05	32	0,7813	0,781

Tabela 7.

*Listeria monocytogenes* ATCC 15313

Relação na-tamicina:LAE	$Q_n$	$Q_{lae}$	$Q_N$	$Q_n/Q_N$	$Q_{LAE}$	$Q_{lae}/Q_{LAE}$	SI
1:1	20	20	1024	1,95E-02	32	0,6250	0,645
1:5	5	25	1024	4,88E-03	32	0,7813	0,786
1:10	2	20	1024	1,95E-03	32	0,6250	0,627
1:100	0,25	25	1024	2,44E-04	32	0,7813	0,781
1:500	0,05	25	1024	4,88E-05	32	0,7813	0,781

5 Tabela 8.

*Bacillus subtilis* ATCC 6633

Relação na-tamicina:LAE	$Q_n$	$Q_{lae}$	$Q_N$	$Q_n/Q_N$	$Q_{LAE}$	$Q_{lae}/Q_{LAE}$	SI
1:1	10	10	2048	4,88E-03	16	0,6250	0,630
1:5	2	10	2048	9,77E-04	16	0,6250	0,626
1:10	1	10	2048	4,88E-04	16	0,6250	0,625
1:100	0,1	10	2048	4,88E-05	16	0,6250	0,625
1:500	0,02	10	2048	9,77E-06	16	0,6250	0,625

Tabela 9.

*Candida albicans* ATCC 10231

Relação na-tamicina:LAE	$Q_n$	$Q_{iae}$	$Q_N$	$Q_n/Q_N$	$Q_{LAE}$	$Q_{iae}/Q_{LAE}$	SI
1:1	1	1	2	5,00E-01	16	0,0625	0,563
1:5	0,7	3,5	2	3,50E-01	16	0,2188	0,569
1:10	0,5	5	2	2,50E-01	16	0,3125	0,563
1:100	0,1	10	2	5,00E-02	16	0,6250	0,675
1:500	0,02	10	2	1,00E-02	16	0,6250	0,635

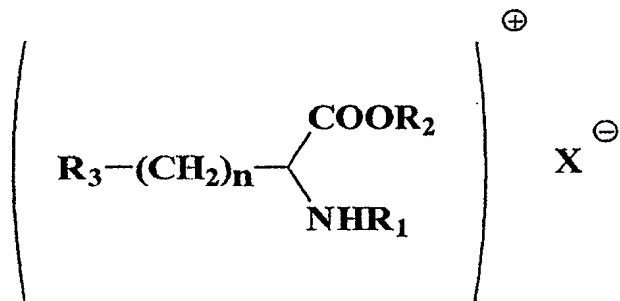
Tabela 10.

*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763

Relação na-tamicina:LAE	$Q_n$	$Q_{iae}$	$Q_N$	$Q_n/Q_N$	$Q_{LAE}$	$Q_{iae}/Q_{LAE}$	SI
1:1	2	2	2,5	8,00E-01	32	0,0625	0,863
1:5	1,5	7,5	2,5	6,00E-01	32	0,2344	0,834
1:10	1	10	2,5	4,00E-01	32	0,3125	0,713
1:100	0,25	25	2,5	1,00E-01	32	0,7813	0,881
1:500	0,05	25	2,5	2,00E-02	32	0,7813	0,801

## REIVINDICAÇÕES

1. Composição sólida compreendendo pelo menos um fungicida de polieno e pelo menos um tensoativo catiônico derivado da condensação de ácidos graxos e aminoácidos dibásicos esterificados, tendo a fórmula:



5

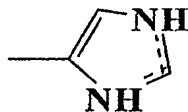
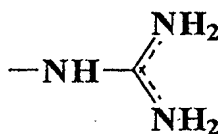
onde:

X<sup>-</sup> é um contraíon derivado de ácido inorgânico ou orgânico, o contraíon sendo de preferência, Br<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup> ou HSO<sub>4</sub><sup>-</sup>,

10 R<sub>1</sub>: é um alquila de cadeia reta de um ácido graxo saturado ou um hidróxi ácido com 8 a 14 átomos de carbono, unido ao grupo α-aminoácido por meio de ligação do tipo amida,

R<sub>2</sub>: é um alquila de cadeia reta ou ramificada de 1 a 18 átomos de carbono ou um grupo aromático,

R<sub>3</sub>: é



15

onde n pode ser de 0 a 4, e

opcionalmente ingredientes como açúcar, sal, antiaglomerantes, antioxidantes, agentes de quelação e agentes espessantes, em que o pelo menos um tensoativo catiônico conservante derivado da condensação de ácidos graxos

e aminoácido dibásico esterificado é o lauramida do monoclórídato de arginina (LAE), e o fungicida de polieno é natamicina, a composição sólida consistindo em 2 – 99,9% em peso de LAE e em 0,1 – 98% em peso de natamicina, a soma sendo 100%,

5 contendo ainda excipientes como açúcar, sal e agente antiaglomerante, em quantidade de 0 – 5 partes, em peso, por 100 partes em peso da quantidade de LAE e natamicina.

2. Método para a preparação de uma dispersão de natamicina pela dispersão da composição sólida, de acordo com a reivindicação 1, em  
10 um solvente.

3. Método de acordo com a reivindicação 2, no qual o solvente é água corrente ou um solvente orgânico como propileno glicol ou glicerina, ou ainda um solvente de grau alimentício, ou uma combinação destes solventes.

15 4. Dispersão de natamicina preparada pelo método como definido na reivindicação 2 ou 3, em que a concentração de natamicina é entre 100 ppm e 10.000 ppm, compreendendo opcionalmente ingredientes como açúcar, sal, antiaglomerantes, antioxidantes, agentes de quelação, tensoativos e agentes espessantes.

20 5. Método para preparação de uma solução aquosa de natamicina pela diluição da dispersão como definida na reivindicação 4 com água.

6. Método para preparação uma solução aquosa de natamicina pela dissolução da composição sólida como definida na reivindicação 1 em água.

25 7. Solução aquosa a ser obtida pelo método como definida na reivindicação 5 ou 6, contendo natamicina, em concentração de 100 a 10.000 ppm, em combinação com LAE, em quantidade de 200 a 100.000 ppm, e opcionalmente compreendendo ingredientes como açúcar, sal, antiaglomerantes, antioxidantes, agentes de quelação, tensoativos e agentes es-  
30 pessantes.

8. Solução aquosa de acordo com a reivindicação 7, na qual a razão em peso de natamicina para LAE é de 1:20 a 1:200.

9. Solução aquosa de acordo com a reivindicação 7 ou 8, na qual a razão preferida em peso de natamicina para LAE é de 1:50 a 1:100.

5 10. Solução aquosa de acordo com qualquer uma das reivindicações 7 a 9, em que a concentração de natamicina é de 0,001 a 0,15% (p/p).

11. Solução aquosa de acordo com a reivindicação 10, em que a concentração de natamicina é de 0,01 a 0,10% (p/p).

12. Uso da solução aquosa como definida em qualquer uma das reivindicações 7 a 11 para o tratamento de produtos alimentícios.

10 13. Uso de acordo com a reivindicação 12 para o tratamento de queijo, produtos frios à base de carne e de laticínios.

14. Uso de acordo com a reivindicação 12 para o tratamento de preparados líquidos, assim como líquidos para bebidas.

15 15. Uso das composições como definidas em qualquer uma das reivindicações 1, 4 e 7 a 11 para o tratamento de preparados cosméticos.

16. Uso das composições como definidas em qualquer uma das reivindicações 1, 4 e 7 a 11 para a preparação de medicamentos para tratar infecções em animais ou seres humanos.

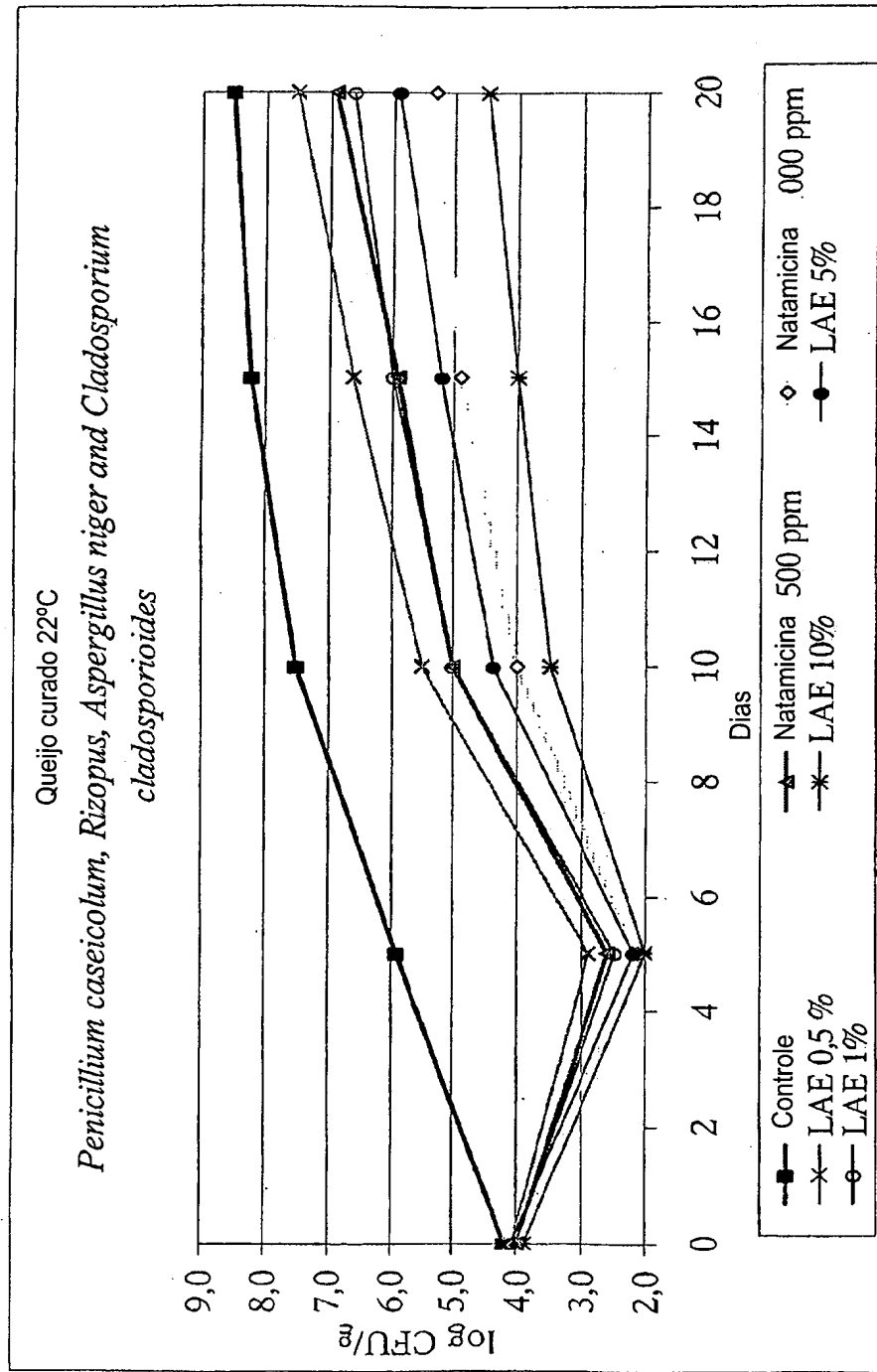


Fig 1.

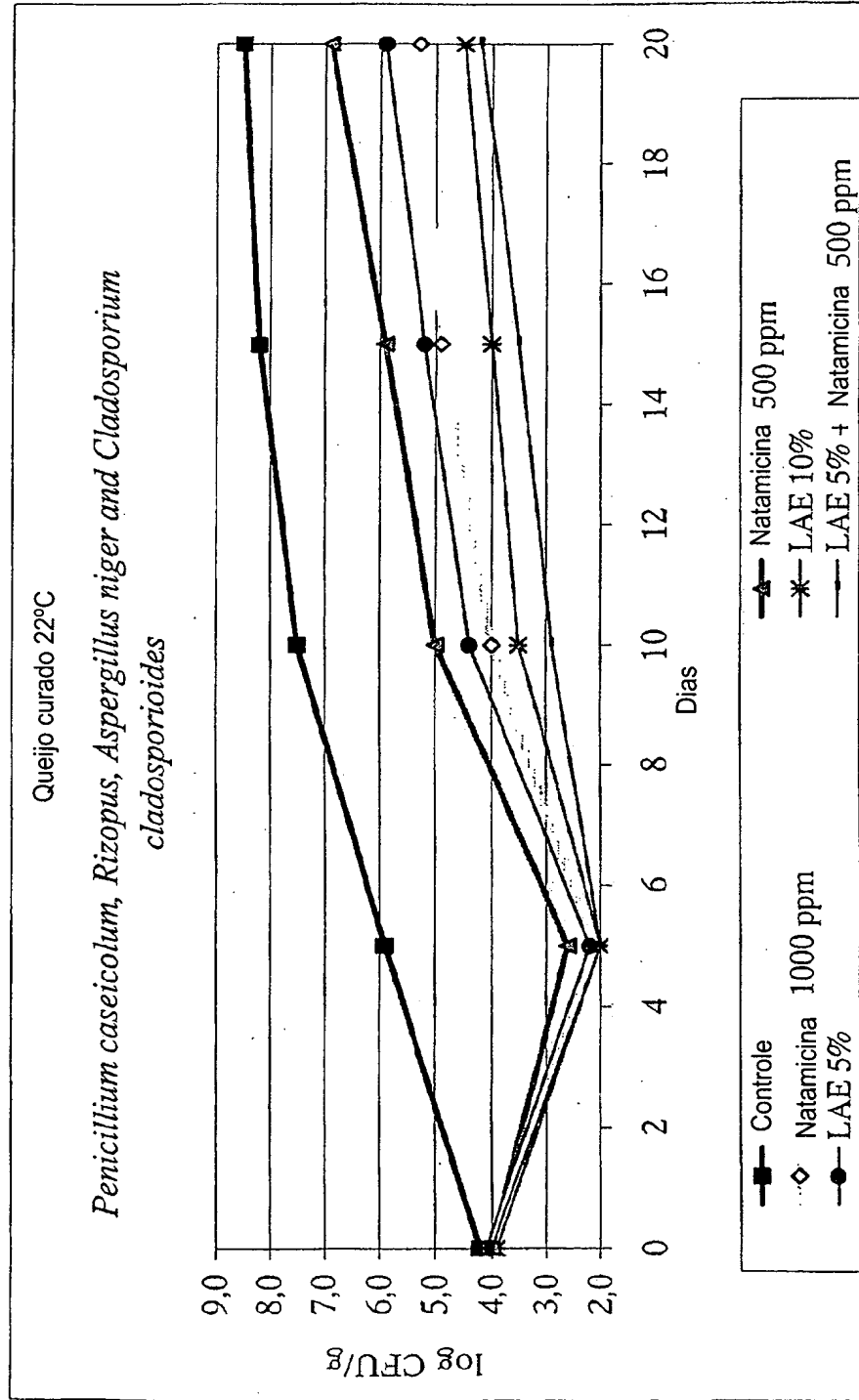


Fig 2.

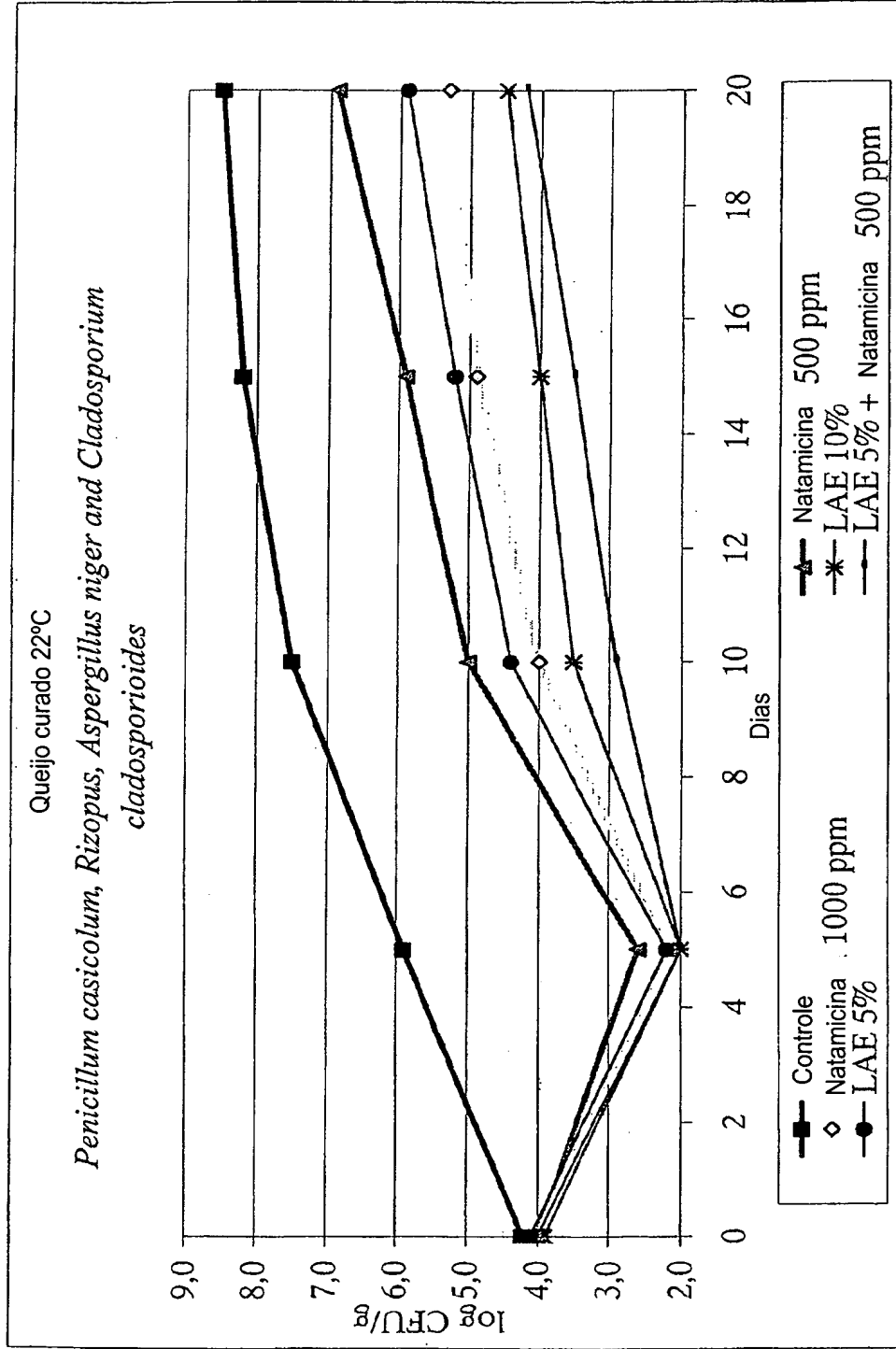


Fig 3.

## RESUMO

Patente de Invenção: **"COMBINAÇÕES DE FUNGICIDA DE POLIENO COM TENSOATIVOS CATIÔNICOS"**.

5 A presente invenção refere-se a uma composição sólida compreendendo um tensoativo catiônico, assim como o éster etílico da lauramida do monoclóridrato de arginina (LAE), e um fungicida de polieno como natamicina. A composição sólida é a base para o provimento de soluções de natamicina de maior concentração. A composição sólida pode ser utilizada para prover uma dispersão de natamicina em um líquido adequado, assim como em água corrente ou solvente orgânico. A dispersão pode ser ainda diluída com água. O resultado é uma solução de natamicina em água. A combinação de tensoativo catiônico com o fungicida de polieno exibe um efeito biológico mais forte do que o de cada um dos dois componentes isolados.

10