

\*PI 07154224\*  
\*PI 07154224\*



**REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL**  
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR  
**INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL**

## CARTA PATENTE Nº PI 0715422-4

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: PI 0715422-4

(22) Data do Depósito: 29/11/2007

(43) Data da Publicação do Pedido: 12/06/2008

(51) Classificação Internacional: A61K 8/34; A61K 8/35; A61K 8/36; A61Q 11/00; A23L 1/226; A23G 3/00

(30) Prioridade Unionista: 01/12/2006 EP 06125259.9

(54) Título: COMPOSIÇÃO AROMATIZANTE ANTIMICROBIANA

(73) Titular: FIRMENICH SA. Endereço: 1, Route Des Jeunes, P.O. Box 239, CH-1211 Geneva 8, Suiça (CH).

(72) Inventor: BARRA, JÉRÔME; SEYFRIED, MARKUS; TASHIRO, HIDEKI; TROCCAZ, MYRIAM; BECCUCCI, SABINE

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 29/11/2007, observadas as condições legais.

Expedida em: 7 de Julho de 2015.

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage  
Diretora de Patentes Substituta

## COMPOSIÇÃO AROMATIZANTE ANTIMICROBIANA

### Campo Técnico

A presente invenção diz respeito a uma composição aromatizante incluindo dois ou mais ingredientes aromatizantes antimicrobianos. A invenção também diz respeito a 5 composições de cuidado bucal ou comestíveis que incluem tal composição aromatizante e à utilização de uma composição aromatizante para fornecer um efeito antibacteriano.

### Dados Preliminares e Arte Anterior

É bastante conhecido que dentro da cavidade bucal existe um grande número e 10 variedade de bactérias. Sabe-se que muitas possuem um efeito nocivo sobre a gengiva, dentes e hálito de um indivíduo levando, por exemplo, à halitose bucal, doença periodontal e cariogênese.

As bactérias são classificadas em termos de sua resposta ao protocolo de coloração de Gram com base em diferenças estruturais em suas paredes celulares. A parede 15 celular das bactérias Gram-positivas contendo um nível mais elevado de peptidoglicanos retém o corante cristal violeta após uma lavagem com álcool e então parecerá azul/púrpura sob o microscópio. As bactérias Gram-negativas não retêm o corante cristal violeta e parecerão vermelhas ou rosa devido à adição do contracorante safranina.

20 Cerca de 90% da halitose origina-se dentro da cavidade bucal. A formação bacteriana de compostos de enxofre voláteis odoríferos (VSC), sulfito de hidrogênio ( $H_2S$ ) e metil-mercaptana ( $CH_3SH$ ) dentro da cavidade bucal, especialmente no revestimento da língua, é a principal causa de mau hálito bucal. A halitose bucal é causada predominantemente por espécies Gram anaeróbicas como a *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*,

Klebsiella pneumoniae, Veillonella alcalescens e Bacteroides melaninogenicus/forsythus. A doença periodontal é causada tanto pelas espécies Gram (+) como Actinomyces e Streptococci quanto Gram (-) como Spirochetes, Bacteroides, Selenomonas sputagena, Fusobacterium nucleatum, Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Porphyromonas endodontalis. Finalmente, a cariogênese é causada pelo metabolismo do açúcar por bactérias reduzindo o pH para menos de 5 e liberando ácido lático, o qual dissolve o fosfato de cálcio nos dentes. A bactéria primordialmente responsável por isso é a *Streptococcus mutans*. Devido às várias espécies bacterianas encontradas na cavidade bucal, há necessidade de agentes antimicrobianos não específicos eficazes com um amplo espectro de atividade. Tais agentes precisarão ser compatíveis com certo número de diferentes preparos, incluindo enxaguatórios bucais, sprays bucais, pastas de dentes e outros dentifrícios, chicletes, balas e produtos funcionais relacionados.

Visto que muitos produtos de cuidado bucal são aromatizados, seria desejável que os ingredientes aromatizantes também proporcionassem efeitos antibacterianos já que isso reduziria a quantidade de ingredientes

A utilização de ingredientes aromatizantes para proporcionar benefícios de cuidado bucal já vem sendo abordada. Por exemplo, JP-A-2004/067530 (Kanebo Ltd) diz respeito a removedores para eliminação da halitose independente da dieta devido a doenças periodontais, doenças viscerais, etc. Os removedores contêm extratos vegetais de Labiate, lactoferrinas, e opcionalmente álcoois de açúcar, polifenóis derivados de plantas, acidulantes e linalol. A composição pode ser empregada em um chiclete.

A WO-A-2003/105794 (Takasago International Corporation) divulga uma composição para sabor e fragrância que possui atividade antibacteriana eficaz contra bactérias

causadoras da doença periodontal e/ou uma ação inibidora da halitose capaz de controlar a produção de sulfitos voláteis. A composição contém ao menos uma substância selecionada entre materiais que dão fragrância aos alimentos tais como hexaldeído, álcool de cariofileno, cinamaldeído, diidroeugenol, farnesol e óleo de toronja.

A WO-A-99/51093 (Innocent Ltd) é direcionada ao uso de uma composição incluindo um álcool mais elevado selecionado entre 1-nonanol, 1-decanol e 1-undecanol, ou misturas dos mesmos, e aditivos que mascaram o gosto, como um preparo antiodor bucal. A composição é descrita para uso em um creme dental, um enxaguatório bucal, balas e outros preparos anti-odor para utilização bucal.

A WO-A-2004/014348 (Michael Gurin) revela uma composição e método para funcionalizar doces, chicletes, produtos de higiene bucal e bebidas através da intensificação do sabor utilizando ingredientes compostos que potencializam, reforçam e ampliam o sabor. A composição também abrange agentes de higiene bucal selecionados para controlar a halitose e a placa dental utilizando polifenóis e enzimas cujos níveis de atividade são protegidos por métodos de estabilização.

A JP-A-2003/026527 (Lion Corporation) diz respeito aos agentes ativos 2,6-dimetil-3,7-octadieno-2,6-diol, 2,6-dimetil-1,7-octadieno-3,6-diol, 3-acetóxi-1-p-mentano, 8-acetoamino-1-p-mentano, 11-hidróxi-8-eudesmeno e extratos de laranja (*zantoxylum*) que contêm C16 ou ácidos graxos insaturados mais elevados e C6 ou aldeídos insaturados mais elevados, para controlar as bactérias *F. nucleatum* na boca sem aparentemente afetar os microorganismos benéficos nos seres humanos.

A EP 1 238 650 (Takasago) diz respeito a composições aromatizantes antimicrobianas e alimentos ou composições para cuidado bucal contendo composições aromatizantes antimicrobianas. Descreve-se que as composições

incluem compostos antimicrobianos aromatizantes diversos. Além disso, vários desses materiais são caracterizados por um CIM abaixo de 1000 ppm contra os microorganismos responsáveis pela halitose bucal. Contudo, o 3,4-dimetilfenol, bem como outros ingredientes como anetol, aldeído hidrocinâmico, isoeugenol extra e

5 ácido 2-metil-hexanóico não são mencionados.

A WO 2005/104842 (MICAP) revela compostos antimicrobianos no campo médico. O 3,4-dimetilfenol é divulgado em uma longa lista de veículos para compostos antimicrobianos, mas ele próprio não é descrito como um antimicrobiano.

Também seria desejável fornecer ingredientes aromatizantes antibacterianos que

10 sejam eficazes em doses bem baixas visto que os ingredientes aromatizantes normalmente não podem ser utilizados em grandes quantidades sem oferecer um sabor excessivo que com frequência é indesejável para o consumidor.

Um objetivo da presente invenção é fornecer um ou mais dos benefícios supramencionados e/ou lidar com um ou mais dos problemas citados acima.

15 **Resumo da Invenção**

Assim sendo, a presente invenção oferece uma composição aromatizante incluindo um elemento antimicrobiano e opcionalmente ao menos um ingrediente aromatizante de uso atual, em que o elemento antimicrobiano inclui 3,4-dimetilfenol junto com um ou mais ingredientes aromatizantes antimicrobianos, cada um

20 contendo uma concentração inibitória mínima de 1000 partes por milhão ou menos contra duas ou mais cepas selecionadas entre *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium sp.*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Veillonella alcalescens*, *Bacteroides melaninogenicus/forsythus*, *Selenomonas sputigena*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella melaninogenicica* e

25 *Streptococcus mutans*.

Em outro aspecto, a invenção fornece um produto de cuidado bucal incluindo a composição aromatizante antimicrobiana.

Em outro aspecto ainda, a invenção proporciona um produto em forma de doce incluindo a composição aromatizante antimicrobiana.

5 Em outro aspecto ainda, a invenção proporciona uma bebida incluindo a composição aromatizante antimicrobiana.

Em um outro aspecto adicional, a invenção proporciona o uso da composição aromatizante em um produto de cuidado bucal, um produto em forma de doce ou bebida para fornecer um efeito antimicrobiano.

10 **Descrição Detalhada da Invenção**

Utiliza-se o termo “antimicrobiano” significando eficaz ao matar, inibir ou desativar ao menos uma proporção de uma ou mais cepas de bactérias.

A concentração inibitória mínima (chamada aqui de CIM) é utilizada para significar a concentração, em partes por milhão, de ingredientes aromatizantes antimicrobianos suficiente para levar a uma completa inibição do crescimento de uma cepa bacteriana.

O tempo de contato bacteriano (aqui chamado de TCB) é definido como uma medida da eficácia com a qual uma solução do produto, em uma concentração definida e/ou após um tempo de contato definido, irá matar um certo tipo de bactéria introduzido naquela solução.

As composições aromatizantes são uma mistura cuidadosamente balanceada de inúmeros ingredientes aromatizantes diferentes nos quais, a fim de adquirir o sabor desejado, há com freqüência quantidades muito pequenas de ingredientes individuais. Portanto, se um ingrediente aromatizante deve ser considerado como

um ingrediente aromatizante antimicrobiano eficaz, deve ser capaz de inibir o crescimento bacteriano mesmo em concentrações muito baixas.

Os presentes inventores surpreendentemente encontraram certos ingredientes aromatizantes com CIM de 1000 ou menos que oferecem excelentes características antimicrobianas para a composição aromatizante na qual estão presentes. São particularmente eficazes as composições em que o 3,4-dimetilfenol está presente.

Assim, o termo “eficaz” quando utilizado para descrever a CIM do ingrediente aromatizante antimicrobiano denota uma CIM de 1000 ou menos.

#### Elemento Essencial Antimicrobiano

O 3,4-dimetilfenol é misturado com ao menos um ingrediente aromatizante com a CIM desejada e preferivelmente o TCB desejado para formar um elemento essencial aromatizante antimicrobiano. Esse elemento essencial pode então ser adicionado a uma composição aromatizante padrão para realçar seu efeito antimicrobiano sem afetar adversamente as características de sabor desejadas.

O elemento essencial antibacteriano pode vantajosamente incluir 3,4-dimetilfenol junto com ao menos 2 sabores com a CIM desejada e preferivelmente a o TCB desejado.

É benéfico, no contexto da presente invenção, que o elemento essencial antimicrobiano inclua mais de um ingrediente antimicrobiano, visto ser importante que o elemento essencial não só ofereça benefícios antimicrobianos, mas que também tenha um perfil de sabor balanceado. Por exemplo, caso o elemento essencial contenha somente um ingrediente, o sabor poderá desequilibrar-se, enquanto que quando dois ou mais sabores estão presentes, exige-se menos de cada ingrediente e o risco inerente de sabores excessivos e desequilibrados é reduzido.

Constatou-se que, a fim de ser eficaz na inibição ou redução da atividade microbiana na cavidade bucal, o elemento essencial antimicrobiano pode estar presente em uma baixa quantidade de 1 a 20% por peso com base no peso total da composição aromatizante. Surpreendentemente, constata-se que níveis baixos como de 1 a 15% 5 por peso, ou mesmo de 1 a 12% por peso, também são eficazes.

Visto que a composição aromatizante costuma ser incorporada ao produto final em um nível de 0,05 a 1% por peso, mais preferivelmente de 0,06 a 0,5% por peso, e ainda mais preferivelmente de 0,07 a 0,3% por peso, o elemento essencial antimicrobiano pode surpreendentemente estar presente em quantidades muito 10 pequenas e ainda assim permanecer eficaz. Por exemplo, o elemento essencial antibacteriano pode estar presente em uma quantidade de 0,001 a 0,5%, mais preferivelmente 0,003 a 0,3, e ainda mais preferivelmente de 0,008 a 0,05% por peso, com base no peso total do produto final.

#### **Concentração Inibitória Mínima**

15 Os ingredientes aromatizantes antimicrobianos utilizados na composição da presente invenção têm uma CIM de 1000 ou menos, mais preferivelmente de 900 ou menos, ainda mais preferivelmente de 850 ou menos, a mais preferível de todas sendo 800 ou menos, contra duas ou mais cepas selecionadas entre *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium sp.*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, 20 *Klebsiella pneumoniae*, *Veillonella alcalescens*, *Bacteroides melaninogenicus/forsythus*, *Selenomonas sputigena*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella melaninogenica* e *Streptococcus mutans*.

Mais preferivelmente ao menos um dos ingredientes aromatizantes antimicrobianos tem a CIM mencionada acima contra 3 ou mais, ou mesmo 4 ou mais, das cepas 25 mencionadas acima.

Também prefere-se que ao menos um ingrediente tenha uma CIM de 1000 ou menos, mais preferivelmente de 900 ou menos, ainda mais preferivelmente de 850 ou menos, a mais preferida de todas sendo 800 ou menos, contra duas ou mais cepas selecionadas entre *Fusobacterium sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Veillonella alcalescens*, *Bacteroides melaninogenicus/forsythus*, *Selenomonas sputigena*,  
5 *Porphyromonas endodontalis* e *Prevotella melaninogenicica*.

Há vários testes bem conhecidos já em existência para determinar a CIM. Veja por exemplo, Mann CM, Markham JL, A New Method For Determining the Minimum Inhibitory Concentration of Essential Oils, *J. of Applied Microbiology*, 1998; 84: 538-10 544.

Para os propósitos da presente invenção, a CIM é medida da seguinte maneira: Uma série de diluições de 16 concentrações variando de 150 ppm a 10000 ppm e incluindo ao menos 500, 800, 850, 900 e 1000 ppm do agente ativo a ser testado é preparada através da dissolução do agente ativo em um solvente apropriado. A série 15 de diluições é então transferida para placas de microtitulação de 96 determinações que foram suplementadas com um meio de crescimento aquoso adequado. As placas são inoculadas com uma cepa de teste microbiana de interesse e incubadas sob agitação a 37°C sob condições anaeróbicas. Após 24 horas, o crescimento da cepa de teste é medida em função da densidade óptica.

20 Tempo de Contato Bacteriano

Além de ter uma concentração inibitória mínima bastante baixa, prefere-se também que o ingrediente aromatizante antimicrobiano tenha a capacidade de matar certas bactérias em pouco tempo.

Isso é particularmente importante visto que o ingrediente aromatizante 25 antimicrobiano estará presente em uma composição de higiene bucal que talvez

esteja em contato com as bactérias na boca somente por um breve período, tipicamente 60 segundos ou menos.

O tempo que um ingrediente leva para matar uma cepa bacteriana pode ser medido *in vitro* utilizando o tempo de contato bacteriano, definido abaixo.

- 5 A morte das bactérias é medida por amostragem da mistura em um curto intervalo de tempo após a efetuação da mistura, interrompendo a ação bactericida e então fazendo crescer as bactérias viáveis remanescentes, as quais podem ser contadas por meio de medição da densidade óptica. A medição da ação bactericida dá-se na forma do tempo utilizado para adquirir um dado nível de ação bactericida, 10 geralmente 99,9% ou a redução logarítmica das contagens bacterianas após um tempo de contato definido.

Na presente invenção, o TCB foi medido inicialmente se diluindo uma amostra do ingrediente aromatizante até 1% em etanol a 25% e então se aplicando uma dosagem de 0,01% a 1%. A redução logarítmica da contagem bacteriana foi então 15 medida após 80 segundos.

Prefere-se que ao menos um dos ingredientes aromatizantes antimicrobianos tenha uma redução logarítmica do TCB de 2 ou mais, mais preferivelmente de 2,5 ou mais, e mais preferível ainda de 3 ou mais, contra a bactéria cariogênica *S. mutans* e/ou uma redução logarítmica de 1 ou mais, mas preferivelmente 2 ou mais, contra as 20 cepas patogênicas anaeróbicas *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Veillonella alcalescens* e *Bacteroides melaninogenicus/forsythus* após um tempo de contato de 80 segundos.

Prefere-se também que ao menos um dos ingredientes aromatizantes antimicrobianos tenha uma redução logarítmica do TCB de 1 ou mais, mais preferivelmente 2 ou mais, contra as cepas anaeróbicas patogênicas *Prevotella* 25

*intermedia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Veillonella alcalescens* e *Bacteroides melaninogenicus/forsythus* após um tempo de contato de 80 segundos.

Os ingredientes aromatizantes antibacterianos podem ser utilizados para substituir, integralmente ou em parte, os materiais antibacterianos convencionais empregados

5 nos produtos aromatizados de interesse, sem reduzir as propriedades antibacterianas do produto. "Materiais antibacterianos convencionais" significam materiais antibacterianos que não estão associados com quaisquer características aromatizantes e frequentemente possuem um aroma indesejável que deve então ser mascarado com ingredientes aromatizantes conhecidos. Por exemplo, enxaguatórios

10 bucais convencionalmente incluem agentes antibacterianos como o triclosano (éter 2', 4, 4'-tricloro-2-hidróxi-difenil), o qual é comercialmente disponível, por exemplo, sob a Marca Registrada Irgasan DP 300 e triclorocarbanilida (TCC) (também conhecido como triclocarbana). O triclosano é um agente antimicrobiano de amplo

15 espectro que é conhecido por proporcionar uma excelente atividade bacteriostática em baixas concentrações tanto contra bactérias Gram-positivas quanto contra Gram-

negativas. O triclosano é o antibacteriano comumente usado em sabões antibacterianos. O TCC é eficaz somente contra bactérias Gram-positivas. Ao incorporar um ou mais materiais aromatizantes antibacterianos em tais produtos, os 20 níveis de triclosano e/ou TCC podem ser reduzidos, com consequentes economias de custos, sem reduzir a eficácia antibacteriana do produto.

Alternativamente, as composições aromatizantes antibacterianas da invenção podem ser usadas em combinação com agentes convencionais antimicrobianos, caso no qual isso mostrou oferecer um efeito sinérgico reforçando o caráter antimicrobiano de tais ingredientes.

25 Através de suas propriedades antimicrobianas e aromatizantes, uma composição

aromatizante preparada de acordo com a invenção é igualmente adequada para aplicações em todos os tipos de produtos de cuidado bucal e/ou em forma de doce.

As composições aromatizantes da invenção podem conter outros constituintes que possuem um efeito positivo ou sinérgico sobre a atividade antimicrobiana dos 5 ingredientes.

Testes têm demonstrado que, além do 3,4-dimetilfenol, os seguintes ingredientes aromatizantes possuem as características desejadas de CIM exigidas pela presente invenção: acetil cedreno, anetol ((e)-1-metóxi-4-(1-propenil)benzeno), Bacdanol® (2-

10 etil-4-(2,2,3-trimetil-3-ciclopenten-1-il)-2-buten-1-ol), Brahmanol® (2-metil-4-(2,2,3-trimetil-3-ciclopenten-1-il)-1-butanol), cashmeran, aldeído cinâmico, dimetil acetal, ciclohexadecen-1-ona, ciclopentadecanolida, ciclopentadecanona, decen-1-ol, diidrofarnesol, cedrol, acetato de cedrila, dodecanal, etilenododecanodioato, aldeído hidrocinâmico, isobutil quinolina, isocanafilciclohexanol, isoeugenol extra, levosandol,

15 Lilial® Ig (3-(4-terc-butilfenil)-2-metilpropanal), mentoxipropano 1,2 diol, ácido atrárico (2,4-diidróxi-3,6-dimetil-benzoato de metila), metil decanal, metil sandeflor, metil undecanal, nerolidol (3,7,11-trimetil-1,6,10-dodecatrien-3-ol), nonanol, nootkatona ((+)-(4r)-4,4a,5,6,7,8-hexahidro-6-isopropenil-4,4a-dimetil-2(3h)-naftalenona), 2-ácido metil-hexanóico, aldeído o-metoxicinâmico, álcool perílico (1,8-p-mentadien-7-ol), Phantolid® (1-(1,1,2,3,3,6-hexametil-5-indanil)-1-etanona),

20 fenilacetraldeído, Sandalore® ((+)-3-metil-5-(2,2,3-trimetil-3-ciclopenten-1-il)-2-pentanol), santalinol ((e)-2-metil-4-(2,2,3-trimetil-3-ciclopenten-1-il)-2-buten-1-ol), trans-2-undecenal, undecanal, undecen-1-ol e 3-dodecenal.

Essa lista não é completa e a pessoa habilitada, seguindo o protocolo detalhado acima para estabelecer a CIM, irá prontamente verificar se um composto 25 aromatizante tem as características antimicrobianas desejadas.

O achado de que certos ingredientes aromatizantes possuem excelentes características antimicrobianas é bastante surpreendente. Em particular, o 3,4-dimetilfenol é examinado na Amicbase (A. Pauli, ReviewScience), uma database em CD-ROM sobre as propriedades inibitórias do crescimento de microorganismos por compostos orgânicos. Neste documento, são dadas as concentrações inibitórias mínimas do 3,4-dimetilfenol contra 6 cepas bacterianas (veja a tabela abaixo). Com exceção da *Mycobacterium tuberculosis*, um patógeno humano não relacionado com qualquer uma das cepas relevantes para os propósitos da presente invenção, são descritos valores de CIM variando entre 2000 e 4000 ppm. Trata-se de uma atividade significativamente inferior àquela que descobrimos na presente invenção.

10

### **Tabela 1**

Cepa de teste	CIM [ppm]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> subsp. <i>tuberculosis</i>	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	2000
<i>Streptococcus sp.</i>	2000
<i>Escherichia coli</i>	4000
<i>Proteus mirabilis</i>	4000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4000

Além disso, conforme descrito na Nucleotide Sequence and Function Analysis of the Complete Phenol/3,4-dimethylphenolcatabolic Pathway of *Pseudomonas* sp. Strain

15

CF600, Shingler, Powlowski, Marklund, Journal of Bacteriology, Feb 1992, 711-724, algumas bactérias podem até mesmo utilizar 3,4-dimetilfenol como uma fonte de carbono e, em tais casos, a presença de 3,4-dimetilfenol estimula o crescimento ao invés de inibi-lo. Portanto, a forte atividade antimicrobiana de 3,4-dimetilfenol não pode ser antecipada.

20

A presença de 3,4-dimetilfenol nas composições da presente invenção confere a tais composições uma forte atividade antimicrobiana.

Preferivelmente, o 3,4-dimetilfenol está presente em uma quantidade de 1 a 20% por

peso, mais preferivelmente de 2 a 15%, e ainda mais preferivelmente de 6 a 12% por peso, com base no peso total do elemento essencial.

Os ingredientes aromatizantes antimicrobianos adicionais preferidos incluem anetol, aldeído hidrocinâmico, acetil cedreno, ciclopentadecanona, nonanol, isoeugenol extra, ácido 2-metil-hexanóico e Brahmanol®.

Caso o elemento essencial inclua ciclopentadecanona, esta preferivelmente se encontra presente em uma quantidade de 1 a 10% por peso, mais preferivelmente de 2 a 7%, ainda mais preferivelmente de 3 a 6%, com base no peso total do elemento essencial.

Se o elemento essencial consistir no isoeugenol extra, este encontra-se preferivelmente presente na quantidade de 1 a 99% por peso, mais preferivelmente de 40 a 97%, mais preferivelmente ainda de 80 a 94%, com base no peso total do elemento essencial.

Se o elemento essencial consistir no acetil cedreno, este encontra-se preferivelmente presente na quantidade de 1 a 45% por peso, mais preferivelmente de 5 a 35%, mais preferivelmente ainda de 15 a 30%, com base no peso total do elemento essencial.

Se o elemento essencial consistir no ácido 2-metil-hexanóico, este se encontra preferivelmente presente na quantidade de 1 a 99% por peso, mais preferivelmente de 60 a 98%, mais preferivelmente ainda de 70 a 95%, com base no peso total do elemento essencial.

Se o elemento essencial consistir no Brahmanol®, este se encontra preferivelmente presente na quantidade de 1 a 50% por peso, mais preferivelmente de 1 a 20%, mais preferivelmente ainda de 1 a 10%, com base no peso total do elemento essencial.

Ainda mais preferivelmente, o ingrediente aromatizante antimicrobiano adicional é selecionado entre o anetol, aldeído hidrocinâmico, isoeugenol extra e ácido 2-metilhexanóico.

Ainda que a escolha dos ingredientes seja ditada por uma CIM de 1000 ou menos e

- 5 preferivelmente um TCB com contagem logarítmica de 2 ou mais contra a bactéria cariogênica *S. mutans* e uma redução logarítmica de 1 ou mais contra cepas anaeróbicas patogênicas após um tempo de contato de 80 segundos, eles obviamente devem ser capazes de oferecer um efeito aromatizante na composição ou deveriam, ao menos, ter um sabor neutro para que possam ser facilmente 10 incorporados aos produtos finais aqui mencionados.

### **Outros Ingredientes Aromatizantes**

O elemento essencial antimicrobiano, opcionalmente junto com ao menos um ingrediente aromatizante de uso corrente, é tipicamente incorporado a um alimento ou produto de cuidado bucal.

- 15 O termo “ingredientes aromatizantes de uso corrente” é utilizado com o significado de ingredientes bem conhecidos da pessoa na arte da aromatização e possuidores das características olfativas necessárias. A contribuição de tais ingredientes aromatizantes para o sabor final será substancialmente ou mesmo puramente para fins de gosto e a escolha desses ingredientes dependerá da natureza do produto a 20 ser aromatizado.

Tais ingredientes aromatizantes são compostos que, devido à sua alta volatilidade ou pressão do vapor, alcançam os receptores olfativos no nariz antes e durante o ato de comer e beber. Para o propósito da presente invenção, um aromatizante é um composto que se caracteriza por uma pressão de vapor de  $\geq 0.01$  Pa a 25°C. A 25 maioria dos aromatizantes possui uma pressão de vapor acima desse valor,

enquanto que os lipídeos, como as gorduras animais, ácido oléico, etc., geralmente têm uma pressão de vapor inferior a isso. Para o propósito da presente invenção e por conveniência, a pressão do vapor é determinada por meio de cálculo. Assim sendo, o método revelado em "EPI suite", 2000 U.S. Environmental Protection Agency, é utilizado para determinar o valor concreto da pressão do vapor de um composto específico ou componente de ingrediente. Esse software está disponível gratuitamente e baseia-se nos valores médios das pressões do vapor obtidos por vários métodos de diferentes cientistas. Tipicamente o ingrediente aromatizante terá uma CIM acima de 1000ppm e por isso não possuirá propriedades antimicrobianas significativas.

Muitos ingredientes aromatizantes adequados de uso atual estão relacionados em textos de referência como no livro de S. Arctander, Perfume and Flavour Chemicals, 1969, Montclair, New Jersey, EUA, ou em suas versões mais recentes, ou em outros trabalhos de natureza similar como Handbook of Flavour Ingredients, de Fenaroli, 1975, CRC Press, ou Synthetic Food Adjuncts, 1947, de M. B. Jacobs, van Nostrand Co., Inc.

Os ingredientes antimicrobianos do elemento essencial, o elemento essencial como um todo ou a composição aromatizante que inclui o elemento essencial pode ser incorporada em qualquer sistema de distribuição ou pode ser encapsulada conforme procedimentos padrão. Assim, a composição aromatizante pode ser encapsulada ou pode incluir um componente encapsulado, o componente encapsulado sendo um ou mais dos ingredientes do elemento essencial ou mesmo o elemento essencial por inteiro.

O encapsulamento do elemento essencial ou da composição aromatizante incluindo o elemento essencial é vantajoso, pois possibilita a liberação rápida e simultânea

dos componentes antimicrobianos do elemento essencial ao invés de uma liberação mais lenta e mais prolongada e é desejável quando se exige a aplicação de uma dose concentrada. Acredita-se que isso possa melhorar ainda mais a eficiência antimicrobiana do elemento essencial.

- 5 A pessoa habilitada na arte está bem ciente da variedade de sistemas de encapsulamento que são adequados para essa finalidade, os seguintes sendo preferidos por suas propriedades de fornecimento de ótimas barreiras contra a oxidação.

O primeiro sistema de encapsulamento preferido é uma matriz vítreia em cujo interior 10 é contida a composição aromatizante ou o elemento essencial antibacteriano. Mais preferivelmente, o sistema de encapsulamento é uma matriz vítreia de carboidrato. O ingrediente da matriz de carboidrato preferivelmente inclui um derivado do açúcar, mais preferivelmente a maltodextrina.

As maltodextrinas particularmente preferidas são aquelas com um DE de 10 a 30, 15 mais preferivelmente de 15 a 25, ainda mais preferivelmente de 17 a 19.

Tipicamente, a composição aromatizante ou o elemento essencial bacteriano é misturado com o material da matriz de carboidrato e uma quantidade apropriada de um plastificante, tal como a água, a mistura é aquecida dentro de uma extrusora com parafuso até uma temperatura acima da temperatura de transição vítreia do 20 material da matriz a fim de formar uma massa fundida capaz de ser expelida por meio de um cubo e então a massa fundida sofre extrusão através de processos estabelecidos, como descrito na arte anterior. Veja por exemplo a aplicação de patente WO 00/25606, publicada em 11 de maio de 2002, ou a WO 01/17372, publicada em 15 de março de 2001, e os documentos nelas citados, cujos conteúdos 25 são por meio desta incluídos por referência.

Caso se deseje, outros componentes da matriz de carboidrato podem estar presentes para aprimorar ainda mais as propriedades de barreira antioxidante.

Outros sistemas de encapsulamento adequados são descritos, por exemplo, na US 4,610,890 ou US 4,707,367, cujos conteúdos são incluídos por referência.

5     **Produtos Finais**

Gêneros alimentícios convencionais nos quais a composição pode ser utilizada incluem doces, como as balas endurecidas por fervimento ou pastilhas para chupar, sendo, assim, mantidos na cavidade bucal por um período prolongado, por exemplo, até 1 minuto, enquanto se permite sua dissolução.

10    Os produtos de higiene bucal adequados incluem enxaguatórios bucais, chicletes e pastas de dente.

A composição aromatizante antimicrobiana também pode ser incorporada em bebidas. As bebidas convencionais onde a composição aromatizante antimicrobiana pode ser incorporada incluem, por exemplo, o refrigerante gaseificado, energéticos, 15    sucos e néctares, bebidas quentes, bebidas em pó e bebidas alcoólicas.

As composições aromatizantes antimicrobianas da invenção também podem ser vantajosamente utilizadas no campo das rações para animais de estimação. Como um exemplo não limitativo de produtos alimentares para animais de estimação, podemos mencionar os ossos mascáveis para cães.

20    **Exemplos**

A invenção agora será ilustrada pelos exemplos seguintes. Todas as quantidades são uma percentagem por peso a não ser que indicado de outro forma.

Exemplo 1

Determinação das concentrações inibitórias mínimas

25    A CIM de vários ingredientes aromatizantes foi avaliada em relação a *Streptococcus*

*mutans* DSM 6178, *Fusobacterium nucleatum* DSM 20482, *Porphyromonas gingivalis* DSM 20709 e *Prevotella melaninogenica*.

O inóculo para o ensaio da CIM foi preparado inoculando-se o material congelado proveniente dos estoques do refrigerador a -80°C sobre placas de ágar (meio Schaedler contendo 5% de sangue ovino – Biomerieux, Suíça), as quais foram 5 cultivadas a 37°C por 24 h em uma jarra plástica sob condições anaeróbicas na presença de CO<sub>2</sub> no caso da *S. mutans*, ou por 48 h na ausência de CO<sub>2</sub> no caso das outras 3 cepas.

As colônias isoladas frescas foram transferidas para o meio de Wilkins-Chalgren 10 líquido (Oxoid, Reino Unido, 25 ml em um balão volumétrico de 100 ml) e incubadas sob as mesmas condições que as acima para a *S. mutans* e por 72h no caso das 3 cepas restantes.

As culturas que haviam atingido uma densidade ótica (medida a um comprimento de onda de 600 nm) entre 0.8 e 1.0 foram lavadas uma vez em meio fresco (5.000 rpm, 15 5 min a 4°C em tubos Falcon de 50 ml) e então diluídas 50 vezes em meio de Wilkins-Chalgren líquido com 0,15% de ágar para a *S. mutans* e *P. gingivalis* ou sem ágar para *F. nucleatum* e *P. melaninogenica*. O inóculo foi então aproveitado imediatamente no teste.

Ensaios de microdiluição semi-automatizados foram realizados utilizando uma 20 estação dispensadora Tomtec Quadra 3 (Tomtec, EUA). Em uma primeira etapa, placas de ensaio (placas estéreis de microtitulação de poliestireno com fundo chato e 96 poços, Nunc, Dinamarca) foram preenchidas com 100 µl do meio específico apropriado para a cepa (conforme usado para a diluição final de 50 vezes, veja acima).

25 Então os cinco materiais-teste foram dissolvidos em etanol (para testar contra a *S.*

*mutans* e *P. gingivalis*) ou em DMSO (para testar contra *F. nucleatum* e *P. melaninogenica*). A linha H de uma placa deep-well estéril de poliestireno e com fundo redondo de 1 ml (Nunc, Dinamarca) foi preenchida com 525 µl de estoques filtrados estéreis dos 5 materiais- teste dissolvidos no solvente apropriado com duas concentrações cada (5 e 20% w/v). Os 2 poços restantes da linha H foram preenchidos com o mesmo volume de solvente (para controle positivo, isto é, crescimento na ausência da matéria-prima, e controle negativo, isto é, esterilidade na ausência do inóculo, respectivamente). As linhas A a G foram preenchidas com 175 µl de solvente estéril pela estação dispensadora. Diluições de 1,5 vezes dos estoques foram então preparadas através da transferência de 350 µl de uma pista para a próxima pista e mistura entre elas, até que a linha A fosse alcançada. Depois disso, alíquotas de 10 µl cada foram transferidas da placa deep-well para as 3 placas de ensaio preparadas na primeira etapa e as placas de ensaio foram preenchidas com 90 µl de inóculo (uma das 4 cepas-teste), exceto a coluna número 12 (controle de esterilidade).

As placas de ensaio foram então vedadas e incubadas sob agitação (160 rpm) a 37°C em uma jarra plástica por 24 h na presença de CO<sub>2</sub> para *S. mutans* e por 72 h na ausência de CO<sub>2</sub> para as outras 3 cepas teste conforme descrito anteriormente para as placas de ágar.

O crescimento foi então determinado medindo-se a densidade ótica a um comprimento de onda de 600 nm em um leitor de placa de microtitulação (Ultramark, BioRad, EUA) após remover o lacre.

O crescimento foi comparado com o controle negativo e a mais baixa entre as concentrações de cada matéria-prima que houvesse levado a uma completa inibição do crescimento da cepa-teste representava a concentração inibitória mínima (valor

CIM). Os resultados somente eram levados em consideração se todos os controles positivos tivessem mostrado níveis esperados de crescimento na ausência da matéria-prima (somente solvente puro adicionado) e os controles negativos permanecessem estéreis.

- 5 Visto que para cada série de matérias-primas por placa de microtitulação os testes eram efetuados em triplicata, os resultados finais foram calculados como a média dos 3 valores CIM.

Os resultados de CIM (ppm) para uma seleção de ingredientes aromatizantes antibacterianos são apresentados na tabela seguinte.

10 **Tabela 2**

Composição	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
3,4-dimetilfenol	150 ou menos	590	500	150 ou menos
Brahmanol®	250	Não testado	250	150 ou menos
Beta-metil ocinol carboxilato	1000	Não testado	150 ou menos	150 ou menos
Aldeído cinâmico	250	Não testado	500	150 ou menos
Acetyl cedreno	250	Não testado	500	150 ou menos
Ácido 2-metil-hexanóico	150 ou menos	1500	500	1300
Ciclopentadecanona	1000	Não testado	1000	150 ou menos

#### **Exemplo 2**

#### **Preparação dos elementos essenciais antimicrobianos**

Os elementos essenciais antimicrobianos com as composições apresentadas na tabela 3 foram preparados pela mistura dos ingredientes até que uma solução homogênea fosse formada.

**Tabela 3**

Ingrediente	Elemento Essencial				
	1	2	3	4	5
Brahmanol®	-	5.2	-	1	-
DMP(1)	4.1	12	8	20	10
Beta-metil ocinol carboxilato	-	-	-	9	-
Nonanol	2.5	25	-	15	-
Ácido 2-metil-hexanóico	93.4	7.8	91	20	90
Acetyl cedreno	-	23	-	20	-
Natactone dextro(2)			1		
Cyclopentadecanona	-	27	-	15	-

5 (1) 3,4-dimetilfenol

(2) (+)-(3S,3AS,6R,7AR)-per-hidro-3,6-dimetil-benzo[B]furan-2-oná (10% PG)

**Exemplo 3**

**Preparação de uma composição aromatizante incluindo um elemento antimicrobiano**

- 10 A composição aromatizante com a formulação apresentada na tabela abaixo foi preparada pela mistura do ingrediente junto com o elemento antimicrobiano até que uma solução homogênea fosse formada.

**Tabela 4**

Ingrediente	Composição aromatizante
Mentol	90
Elemento essencial 3	10

**Exemplo 4**

**Pasta de dente incluindo os elementos antimicrobianos**

Composições de higiene bucal foram então preparadas utilizando os elementos

antimicrobianos como a seguir:

Pastas de dente com as formulações apresentadas na tabela abaixo foram preparadas pela mistura de água e xilitol para formar uma solução aquosa, adicionando glicerina (na qual carragenana havia sido anteriormente dispersada) 5 seguido por sorbitol e então misturando por um período de cerca de 20 minutos para hidratar a goma. A mistura foi então introduzida em um misturador sob vácuo e os ingredientes restantes foram adicionados no misturador a vácuo. A mistura sob vácuo foi realizada por um período de cerca de 15 minutos e a mistura final foi então colocada em um tubo convencional.

10 Tabela 5

Ingrediente	Pasta de dente 1	Pasta de dente 2
Glicerina vegetal	10	30
Sorbitol	20	10
Sílica hidratada	20	15
Água	20	10
Xilitol	17	30
Carragenana	3	2
SLS (1)	3	1
Dióxido de titânio	2	1
Composição	3	0.1
aromatizante		

(1) lauril sulfato de sódio

#### Exemplo 5

#### Enxaguatório bucal incluindo os elementos antimicrobianos

Enxaguatórios bucais com as formulações apresentadas na tabela abaixo foram 15 preparados através da dissolução dos ingredientes sólidos na água, adicionando o elemento antibacteriano e agitando para garantir um produto homogêneo.

Tabela 6

Ingrediente	Enxaguatório 1	Enxaguatório 2
Gluconato de	0.1	0.5

clorexidina		
Xilitol	3.0	2.0
Álcool etílico	5.0	3.5
Água destilada	90.0	90.0
Composição	1.9	4.0
aromatizante		

**Exemplos 5a e 5b****Balas incluindo os elementos antimicrobianos**

(5a) Uma bala com a formulação apresentada na tabela abaixo foi preparada cozinhando-se os ingredientes juntos (separados do elemento antimicrobiano) a 140 °C cerca de 20 min até que todos os componentes estivessem totalmente misturados. O elemento antimicrobiano foi então misturado, após o que a massa foi derramada sobre uma laje, sovada e resfriada. A massa da bala, a 70 °C, foi moldada de acordo com processos convencionais utilizando rolos imersores.

**Tabela 7**

Ingrediente	Amostra 1
Sacarose	57.0
Xarope de milho DE 40	35.0
Corante	0.05
Composição	0.6
aromatizante	
Água residual	até 100

(5b) Uma bala sem açúcar foi preparada através da mistura de isomalte com água, aquecendo a mistura até 160 °C e então resfriando a mesma rapidamente até 135 °C, seguido por adição de 2 ml de solução HIS (10% por peso de aspartame, 5% por peso de potássio de acessulfame e 85% de água), opcionalmente junto com 3 ml de solução de ácido cítrico (50% por peso de sólidos de ácido cítrico, 50% por peso de água). A composição aromatizante foi então adicionada em uma quantidade de 0,1% de peso com base no peso total da bala e a mistura líquida foi derramada em moldes para ejeção vazios e deixou-se que se solidificasse.

**Exemplo 6****Chiclete incluindo os elementos antimicrobianos****Tabela 8**

Ingrediente	Amostra 1
Sorbitol cristalino (P56)	54.8
Potássio de acessulfame	0.1
Aspartame	0.1
Goma-base (ex. Cafosa)	22
Xarope umectante (Lycasin ® 80/55, ex. Roquette)	12
Sorbit ® (78% de sólidos)	6
Glicerina (99% de sólidos)	4
Composição aromatizante	0.1

O sorbitol, potássio de acessulfame e aspartame foram misturados juntos em um

5 misturador Turbula. Metade da mistura em pó foi então misturada com a goma-base que havia sido pré-aquecida em um misturador com lâminas sigma de 50 a 55°C por 5 minutos. O pó restante, o umectante, os sólidos de Sorbit® e a glicerina foram adicionados à goma-base e misturados por 7 minutos. Por fim, adicionou-se a composição aromatizante antibacteriana.

10 Exemplo 7

**Teste de tempo de contato bacteriano**

3 amostras foram preparadas com um aroma convencional isoladamente ou combinadas com um elemento aromatizante antimicrobiano da invenção. A composição das amostras encontra-se resumida na tabela seguinte:

15 **Tabela 9**

Amostra N°	Elemento antimicrobiano
2	Nenhum
3	6
4	7

Como aroma convencional foi utilizada uma composição aromatizante de tipo cítrico contendo somente ingredientes aromatizantes que não são ingredientes adequados

para o elemento antimicrobiano de acordo com a presente invenção (isto é, que possuem uma CIM acima de 1000 contra as cepas bacterianas citadas nesta aplicação).

Os elementos aromatizantes antimicrobianos 6 e 7 foram preparados misturando-se 5 os seguintes ingredientes nas seguintes proporções:

**Tabela 10**

Ingredientes	Elemento 6	Elemento 7
Ácido 2-metil-hexanóico	930	910
3,4-dimetilfenol	60	80
Natactone dextro (1)	10	10

(1) (+)-(3S,3AS,6R,7AR)-per-hidro-3,6-dimetil-benzo[B]furan-2-onA (10% PG)

Uma cultura pura de *Fusabacterium nucleatum* foi cultivada em condições anaeróbicas durante 72 horas em meio de Wilkins-Chalgren líquido (Biomérieux).

10 Uma alíquota de  $10^7$  células foi adicionada a 100  $\mu\text{l}$  de cada amostra em uma placa de microtitulação de 96 poços e misturada minuciosamente durante 30 s. Isso foi repetido 11 vezes para cada uma das amostras. Um controle foi efetuado em um poço com  $10^7$  células que não tiveram contato com amostra alguma. A esterilidade do meio foi verificada com um poço contendo somente o meio de crescimento 15 bacteriano.

Permitiu-se que a placa tivesse um tempo de contato bacteriano de 80 s. Qualquer atividade antimicrobiana das amostras era então neutralizada por uma rápida diluição de 1000 vezes em meio de caldo líquido. Eram realizadas diluições seriais (100 $\mu\text{l}$  para 100 $\mu\text{l}$  de meio de crescimento) até que as bactérias fossem extintas.

20 A determinação do crescimento bacteriano e as contagens bacterianas foram realizadas por meio de densidade ótica a 600 nm após 72 horas de incubação em condições anaeróbicas. Considerou-se que os poços sem crescimento apresentavam um número de bactérias sobreviventes igual a zero. Portanto,

considerou-se que o primeiro poço com crescimento continha no mínimo uma célula viável (valor logarítmico 10 de zero) antes da incubação de 72 horas. As contagens de bactérias nos poços de controle foram utilizadas para deduzir a redução percentual de bactérias (ou redução logarítmica bacteriana) para cada aromatizante:

5 Redução logarítmica bacteriana

=

$$\text{Log} [(\text{contagem bacteriana média nos poços de controle}) / (\text{contagem bacteriana média nas amostras-teste})]$$

Os elementos antimicrobianos 6 e 7 provaram ser os mais eficientes no presente

10 teste *in vitro*.

A tabela seguinte resume os resultados do ensaio. Nenhum efeito antimicrobiano foi observado com a composição aromatizante cítrica convencional, enquanto que com a adição do elemento antimicrobiano 6 ou 7 a mistura mostrou uma boa eficiência de eliminação bacteriana.

15 **Tabela 11**

Amostra 2	Desvio-padrão	Amostra 3	Desvio-padrão	Amostra 4	Desvio-padrão
0.00	0.15	1.72	0.25	1.51	0.22

**Exemplo 8**

Avaliação in vivo de um enxaguatório bucal contendo a composição aromatizante antimicrobiana.

20 Os objetivos eram avaliar a eficácia da base do enxaguatório bucal não alcoólico contendo 0,2% de aromas de menta na redução da carga total de bactérias cultiváveis na saliva tanto 1 min quanto 1 hora após um bochecho de 1 minuto. Dois aromas de menta diferentes foram comparados. Estes foram preparados conforme

resumido na tabela abaixo, utilizando a mesma base aromatizante, isoladamente ou junto com um elemento antimicrobiano de acordo com a invenção.

**Tabela 12**

	Aroma de menta 1	Aroma de menta 2
Elemento essencial 8	0	25
Base	100	75

Tal base de aroma de menta contém somente ingredientes aromatizantes que não  
5 são adequados para o elemento antimicrobiano de acordo com a presente invenção  
(isto é, que possuem uma CIM acima de 1000 contra as cepas bacterianas citadas  
na presente aplicação).

O elemento aromatizante antimicrobiano 8 foi preparado através da mistura dos seguintes ingredientes nas seguintes proporções:

10 **Tabela 13**

Ingredientes	Proporções (%)
Ácido 2-metil-hexanóico	36.2
3,4-dimetilfenol	3.2
Natactone dextro	0.4
Eugenol F	3.2
Anetol natural	43.0
Óleo de <i>Eucalyptus globulus</i> (eucalipto)	10.7
Aldeído cinâmico	3.2

Os enxaguatórios sem álcool foram preparados, cada um com cada aroma de menta 1 e 2, através da mistura dos seguintes ingredientes nas seguintes proporções:

**Tabela 14**

Ingredientes	Proporções (%)
Água (desmineralizada)	82.68
Monofluorofosfato de sódio	0.05
Sacarina sódica	0.03
Benzoato de sódio	0.20
Sorbitol (70% )	8.02
Glicerina	8.02

Etanol (95%)	0.00
Cremophor® CO40	1.00
Aroma de menta (sobre água)	0.2

O painel era composto de 24 sujeitos com idades entre 25 e 40 anos. São não-fumantes, com boa saúde geral, e não deveriam ter tomado antibióticos 2 meses antes do início do ensaio. Não deveriam ter sinal de problemas bucais. Solicitou-se que os sujeitos não comessem ou bebessem à meia-noite do dia anterior à experiência. Foi dada a eles uma pasta de dentes não aromatizada sem qualquer Triclosan® para utilizar na semana anterior. Solicitou-se que chegassem cedo pela manhã e enxaguassem a boca durante um minuto. A carga total de bactérias cultiváveis em sua saliva foi determinada antes do enxágüe. A mesma mensuração foi realizada tanto 1 minuto quanto 1 hora após o enxágüe. Amostras de saliva (1mL) foram colhidas em tubos Falcon estéreis de 50 ml. Um volume de transferência de 500 µl de saliva foi armazenado em temperatura-ambiente em frascos de transporte Portagerm (Biomerieux) não mais do que uma hora antes da contagem bacteriana. Foram efetuadas diluições seriais ( $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ ) em água fisiológica, sendo plaqueadas duas vezes sobre placa de ágar Schaedler através do plaqueador Spiral (instrumentos IUL) para contar o total de bactérias anaeróbicas após 72 horas de incubação a 37°C.

Os percentuais de redução nas contagens bacterianas antes e depois do enxágue para cada um dos enxaguatórios foram comparados. Um minuto após o enxágüe, o aroma de menta 2 (contendo o elemento antimicrobiano da invenção) já comprovou obter uma melhor percentagem de redução das contagens bacterianas do que o enxaguatório com o aroma de menta 1. Esse resultado foi confirmado pelo percentual de redução das contagens bacterianas uma hora após o enxágüe. O

enxaguatório contendo o aroma de menta 2 obteve um excelente efeito antimicrobiano, até mesmo consideravelmente melhor do que um minuto após o enxágüe. O outro enxaguatório foi muito menos eficiente e o percentual de redução nas contagens bacterianas foi somente um pouco aprimorado após uma hora.

## REIVINDICAÇÕES

1. COMPOSIÇÃO AROMATIZANTE INCLUINDO UM ELEMENTO ANTIMICROBIANO E OPCIONALMENTE AO MENOS UM INGREDIENTE AROMATIZANTE DE USO CORRENTE, caracterizado pelo elemento antimicrobiano incluir 3,4-dimetilfenol junto com um ou mais ingredientes aromatizantes antimicrobianos, cada um com uma concentração inibitória mínima de 1000 partes por milhão contra duas ou mais cepas selecionadas entre *Fusobacterium Nucleatum*, *Fusobacterium sp.*, *Porphyromonas Gingivalis*, *Prevotella Intermedia*, *Klebsiella Pneumoniae*, *Veillonella Alcalescens*, *Bacteroides Melaninogenicus/forsythus*, *Selenomonas Sputigena*, *Porphyromonas Endodontalis*, *Prevotella Melaninogenica* e *Streptococcus Mutans*.

2. COMPOSIÇÃO AROMATIZANTE INCLUINDO UM ELEMENTO ANTIMICROBIANO E OPCIONALMENTE AO MENOS UM INGREDIENTE AROMATIZANTE DE USO CORRENTE, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ao menos um dos ingredientes aromatizantes antimicrobianos tenha uma concentração inibitória mínima inferior a 800 partes por milhão.

3. COMPOSIÇÃO AROMATIZANTE INCLUINDO UM ELEMENTO ANTIMICROBIANO E OPCIONALMENTE AO MENOS UM INGREDIENTE AROMATIZANTE DE USO CORRENTE, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado por ao menos um dos ingredientes aromatizantes antimicrobianos ter uma redução na contagem logarítmica do tempo de contato bacteriano de 2 ou mais contra a bactéria cariogênica *S. mutans* e/ou uma redução de contagem logarítmica de 1 ou mais contra as cepas patogênicas anaeróbicas após um tempo de contato de 80 segundos.

4. COMPOSIÇÃO AROMATIZANTE INCLUINDO UM ELEMENTO

**ANTIMICROBIANO E OPCIONALMENTE AO MENOS UM INGREDIENTE AROMATIZANTE DE USO CORRENTE**, de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado por** incluir de 1 a 20% por peso do elemento antimicrobiano, com base no peso total da composição aromatizante.

5   **5. COMPOSIÇÃO AROMATIZANTE INCLUINDO UM ELEMENTO**

**ANTIMICROBIANO E OPCIONALMENTE AO MENOS UM INGREDIENTE AROMATIZANTE DE USO CORRENTE**, de acordo com qualquer uma das

reivindicações anteriores, **caracterizado pelo** elemento antimicrobiano incluir 3,4-dimetilfenol junto com um ou mais ingredientes selecionados entre 3-dodecenal,

10   acetil cedreno, miristato de isopropila, anetol, 2-etil-4-(2,2,3-trimetil-3-ciclopentenona-1-il)-2-buteno-1-ol, 2-metil-4-(2,2,3-trimetil-3-ciclopentenona-1-il)-1-butanol, cashmeran, cedrol, acetato de cedrila, aldeído cinâmico, dimetil acetal, ciclo-hexadecen-1-ona, ciclopentadecanolida, ciclopentadecanona, decen-1-ol, dihidrofarnesol, dodecanal, etileno-dodecanodioato, helional, quinolina de isobutila,

15   isocanfílciclohexanol, isoeugenol extra, levosandol, 3-(4-terc-butilfenil)-2-metilpropanal, mentoxipropano-1,2-diol, 2,4-diidróxi-3,6-dimetilbenzoato de metila, metil decanal, metil sandeflor, metil undecanal, nerolidol, nonanol, nootkatona, ácido 2-metil-hexanóico, aldeído o-metoxicinâmico, álcool perílico, 1-(1,1,2,3,3,6-hexametil-5-indanil)-1-etanona, fenilacetaldeído, (+)-3-metil-5-(2,2,3-trimetil-3-

20   ciclopentenona-1-il)-2-pentanol, santalinol, trans-2-undecenal, undecanal e undecen-1-ol.

**6. COMPOSIÇÃO AROMATIZANTE INCLUINDO UM ELEMENTO**

**ANTIMICROBIANO E OPCIONALMENTE AO MENOS UM INGREDIENTE AROMATIZANTE DE USO CORRENTE**, de acordo com qualquer uma das

25   reivindicações anteriores, **caracterizado pelo** elemento antimicrobiano incluir 3,4-

dimetilfenol junto com um ou mais ingredientes selecionados entre acetil cedreno, ciclopentadecanona, nonanol, isoeugenol extra, ácido 2-metil-hexanóico e 2-metil-4-(2,2,3-trimetil-3-ciclopentenona-1-il)-1-butanol.

**7. COMPOSIÇÃO AROMATIZANTE INCLUINDO UM ELEMENTO**

**5 ANTIMICROBIANO E OPCIONALMENTE AO MENOS UM INGREDIENTE AROMATIZANTE DE USO CORRENTE,** de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado pelo** 3,4-dimetilfenol estar presente em uma quantidade de 1 a 20% por peso, com base no peso total do elemento essencial.

**10 8. COMPOSIÇÃO AROMATIZANTE INCLUINDO UM ELEMENTO**

**ANTIMICROBIANO E OPCIONALMENTE AO MENOS UM INGREDIENTE AROMATIZANTE DE USO CORRENTE,** de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, **caracterizado pela** composição aromatizante ou o elemento antimicrobiano ser encapsulado.

**15 9. PRODUTO DE HIGIENE BUCAL, caracterizado por** incluir a composição aromatizante de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores.

**10. BEBIDA, caracterizada por** incluir a composição aromatizante de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7.

**11. PRODUTO DE CONFEITARIA, caracterizado por** incluir a composição aromatizante de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 7.

**20 12. USO DE UMA COMPOSIÇÃO AROMATIZANTE,** conforme definido em qualquer uma das reivindicações de 1 a 7, **caracterizado por** ser em um produto de higiene bucal, um produto de confeitoraria ou uma bebida para proporcionar um efeito antimicrobiano.

**RESUMO**

**“COMPOSIÇÃO AROMATIZANTE ANTIMICROBIANA”.** Uma composição aromatizante para utilização em um produto de higiene bucal, produto de confeitoraria ou bebida inclui um elemento antimicrobiano e opcionalmente ao menos um 5 ingrediente aromatizante de uso corrente, onde o elemento antimicrobiano inclui 3,4-dimetilfenol junto com um ou mais ingredientes aromatizantes antimicrobianos, cada um tendo uma concentração inibitória mínima de 1000 partes por milhão ou menos, contra duas ou mais cepas selecionadas entre *Fusobacterium Nucleatum*, *Fusobacterium sp.*, *Porphyromonas Gingivalis*, *Prevotella Intermedia*, *Klebsiella Pneumoniae*, *Veillonella Alcalescens*, *Bacteroides Melaninogenicus/forsythus*, 10 *Selenomonas Sputigena*, *Porphyromonas Endodontalis*, *Prevotella Melaninogenica* e *Streptococcus Mutans..*