

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 217**

51 Int. Cl.:

A23K 20/195 (2006.01)
A23K 20/00 (2006.01)
A23K 50/00 (2006.01)
A01N 31/00 (2006.01)
A23L 3/3463 (2006.01)
A23L 3/3472 (2006.01)
A23L 3/3508 (2006.01)
A23L 3/3535 (2006.01)
A01N 37/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2010 E 10807056 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2461700**

54 Título: **Agentes conservantes de agua y piensos**

30 Prioridad:

06.08.2009 US 231930 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

27.06.2016

73 Titular/es:

**ANITOX CORPORATION (100.0%)
1055 Progress Circle
Lawrenceville, GA 30043, US**

72 Inventor/es:

**RICHARDSON, KURT;
PIMENTEL, JULIO y
WILSON, JAMES D.**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 575 217 T3

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

DESCRIPCIÓN

Agentes conservantes de agua y piensos

Fundamento de la invención

Campo de la invención

- 5 Un método para extender la vida útil de agua, piensos o ingredientes mayores de piensos mediante tratamiento por atomización o mezcla de una mezcla de ácidos orgánicos que contienen ácido pelargónico.

Fundamento

- 10 Las enfermedades transmitidas por alimentos son problemas comunes para millones de personas alrededor del mundo. Las enfermedades transmitidas por alimentos son causadas por muchos diferentes microorganismos, incluyendo infecciones por *Campylobacter* spp., *Shigella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Yersenia enterocolitica*, *Salmonella* spp. y *E. coli* que son prevalentes en muchos países. Las estadísticas del CDC en los Estados Unidos sugieren que 76 millones de personas se enferman cada año debido al consumo de carne, huevos, mariscos, productos lácteos no pasteurizados y vegetales no lavados. Los animales que producen alimentos son el mayor reservorio de serotipos no-typhi de *Salmonella* entérica, la cual causa un estimado de 1.4 millones de enfermedades, 16,400 hospitalizaciones y 580 muertes/año en los Estados Unidos.

La *Salmonella* es un patógeno intracelular facultativo, capaz de infestar seres humanos y animales, dando como resultado una infección. Después de la ingestión, la *Salmonella* puede escapar de los confines del intestino, puede penetrar el intestino y puede ser transportada por la sangre a órganos internos (Henderson, S. et. al., 1999, Early events in the pathogenesis of avian salmonellosis, *Infec. Immun.* 67(7): 3580-3586).

- 20 La mayoría de los casos de salmonellosis en humanos aparecen debido al consumo de huevos de gallina. Dos días después de que las gallinas han sido infectadas oralmente con *Salmonella*, la bacteria puede ser detectada en tejidos de bazo, hígado, corazón, vesícula biliar, tejidos intestinales y diferentes secciones del oviducto (Humphrey, T.J. et. al, 1994, Contamination of egg shell and contents with *Salmonella* enteritidis, *Int. J. Food Microbiol* 21 (1-2): 31-40). Algunos factores presentes en los nuevos ayudan a mantener bajos niveles de *Salmonella* en huevos recientemente puestos (incidencia de 0.6%) incluso aunque los huevos del oviducto de la misma gallina mostraran elevados niveles de salmonella (incidencia de 29%); estos factores pueden incluir anticuerpos, enzimas antibacteriales y agentes que secuestran el hierro y proteínas bacterianas inhibidoras de proteasa en yema y albúmina (Keller, L.H. et. al., 1995, *Salmonella* enteritidis colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. *Infec. Immun.* 63(7): 2443-2449)

- 30 La incidencia de *Salmonella*, *E. coli* y *Enterococcus* varía dependiendo del tipo de ingredientes usados en la fabricación de pienso para animal. Existe mayor incidencia de *Salmonella* en piensos para animales procedentes de desechos procesados (35%) que en alimentos a base de plantas (5%). La incidencia de *E. coli* es similar tanto en alimentos derivados de animales como de plantas (40%), pero la incidencia de *Enterococcus* es 80% en alimentos derivados de animales y 91% en alimentos derivados de plantas. La incidencia de contaminación por *Salmonella* en piensos para animales es mayor en forma macerada que en forma de pellas. La transformación en pellas bajo condiciones de alta temperatura y alta presión reduce el número no sólo de *Salmonella* sino también de otras bacterias. Un problema con la producción simple de pellas es que no existe protección contra la recontaminación microbiana del pienso antes de que sean consumidas por el animal, tal como la colocación en bolsas, transporte y colocación en los dispensadores de piensos.

- 40 La presencia de diarrea en terneros tiene importancia económica. Más del 90% de diarrea en terneros es producida por *E. coli* y *Salmonella* y *Clostridia*. Se conocen métodos preventivos, tales como (1) vacunación de las madres con objeto de transferir de manera pasiva anticuerpos en el calostro; (2) uso de suplementos inmunes para los sustitutos de leche; (3) uso de probióticos para crear un ambiente saludable en el tracto gastro-intestinal, y (4) cambios en la labranza. Ninguna de estas medidas protectoras es 100% efectiva.

- 45 La incidencia de diarrea en neonatos y lechones destetados también es muy alta. Nuevamente, *E. coli* y *Salmonella* son los principales microorganismos involucrados en la diarrea en cerdos. Uno de los métodos preferidos para prevenir este problema es el destete prematuro segregado (SEW). La base del destete prematuro es que cuanto más temprano sean destetados de la cerda los lechones, menores serán las posibilidades de enfermedades cruzadas entre la cerda y los lechones. Tanto en la diarrea del ternero como del lechón, el método

de tratamiento preferido es con antibióticos.

5 La comunidad europea (EU) ha prohibido el uso de cinco antibióticos y FDA en los Estados Unidos está prohibiendo el uso de fluoroquinolona en animales, debido al desarrollo de resistencia a este antibiótico. La resistencia bacteriana ha promovido el desarrollo de productos alternativos a los antibióticos. Todos los estados de la Unión Europea han prohibido el uso de antibióticos como promotores de crecimiento, y esto se ha extendido a todos los países que exportan carne o sus derivados a la EU.

Se han desarrollado muchos productos para la preservación de agua y piensos para uso animal, incluyendo aditivos para el agua tales como productos de amonio cuaternario, productos basados en clorito, cloración, dióxido de cloro y ácidos orgánicos (acético, sorbato, ascórbico, cítrico, fórmico).

10 Los métodos para la preservación de piensos incluyen el tratamiento térmico, ácidos orgánicos, formaldehído, aceites esenciales e irradiación. La eliminación de Salmonella con ácidos orgánicos requiere altos niveles de tratamiento, lo cual implica elevado costo para la industria animal. La irradiación de piensos no es efectiva desde el punto de vista de costo y no es amigable con el consumidor. El percarbonato de sodio es un oxidante poderoso que es usado como un antimicrobiano en piensos a niveles de 1-2% de la dieta.

15 El tratamiento con clorato es recomendado para E coli y Salmonella dado que éstas bacterias tienen la enzima nitrato reductasa que reduce clorato a clorito, que tiene propiedades antimicrobianas. Cerdos desafiados con Salmonella, cuando se administraron iones clorato a través del agua antes del sacrificio, tuvieron recuentos reducidos de bacterias en el contenido intestinal y tejido de la linfa (Anderson, R.C. et. al. 2004, Effect of drinking-water administration of experimental chlorate ion preparations on Salmonella enterica serovar Typhimurium colonization in weaned and finished pigs, Vet. Res. Comm. 28(3): 179-189).

20 Los ácidos orgánicos han sido un aditivo mayor para reducir la incidencia de infecciones transmitidas por alimentos. El uso de ácidos grasos de cadena corta, media y larga, por ejemplo fórmico, propiónico, butírico, láctico, cítrico, málico y otros ha sido reportado como exitosos en algunos casos. Los ácidos grasos de cadena corta ejercen su actividad microbiana debido a que los grupos ácido RCOOH no disociados (no ionizados) son permeables a los lípidos, y por ello, pueden cruzar la pared celular microbiana y disociarse en el interior más alcalino de los microorganismos (RCOOH \rightarrow RCOO⁻ + H⁺) haciendo el citoplasma inestable para la supervivencia. El uso de ácidos orgánicos, especialmente ácidos fórmico y propiónico, están bien documentados en la técnica. Pero se hace referencia al ácido pelargónico sólo como un herbicida y un fungicida para usos en plantas, no para la preservación de agua y piensos para animales.

30 El ácido pelargónico es un ácido graso de ocurrencia natural, encontrado en casi todas las especies de animales y plantas. Dado que contiene nueve átomos de carbono, es llamado también ácido nonanoico y tiene la fórmula química CH₃(CH₂)₇COOH. Es encontrado en bajos niveles en muchos alimentos comunes y es degradado fácilmente en el ambiente. Es un fluido incoloro aceitoso que solidifica a temperaturas bajas. Tiene un olor rancio desagradable y es casi insoluble en agua.

35 El ácido pelargónico es usado como un herbicida no selectivo. Scythe (57% de ácido pelargónico, 3% de ácidos grasos relacionados y 40% de material inerte) es un herbicida de amplio espectro, para después de la emergencia o de la quema, producido por Mycogen/Dow Chemicals. El modo de acción herbicida del ácido pelargónico se debe primero a una ruptura de la membrana en la oscuridad o la luz, y segundo peroxidación conducida por radicales formados en la luz por clorofila sensibilizada desplazada desde la membrana tilacoide (B. Lederer, T. Fujimori., Y. Tsujino, K. Wakabayashi and P. Boger; Phytotoxic activity of middle-chain fatty acids II: peroxidation and membrane effects. Pesticide Biochemistry and Physiology 80:151-156)

40 Chadeganipour y Haims (Antifungal activities of pelargonic and capric acid on Microsporum gypseum Mycoses Vol. 44, número 3-4 pp 109-112, 2001) mostraron que la concentración mínima inhibidora (MIC) para prevenir el crecimiento de M. gypseum en medio sólido era 0.02 mg/ml de ácido cáprico, y 0.04 mg/ml para ácido pelargónico. En medio líquido era 0.075 mg/ml de ácido cáprico, y 0.05 mg/ml de ácido pelargónico. Estos ácidos fueron probados de manera independiente, y no como una mezcla.

50 N. Hirazawa, et al. (Antiparasitic effect of medium-chain fatty acids against ciliated Crptocaryon irritans infestation is the red sea bream Pagrus major, Aquaculture, 198:219-228, 2001) encontraron que el ácido nonanoico así como ácidos grasos C₆ a C₁₀ fueron efectivos en el control del crecimiento del parásito C. irritans y que C₈, C₉ y C₁₀ fueron los más potentes.

Se encontró que Trichoderma harzianum, un biocontrol para plantas de cacao, produce ácido pelargónico como

una de muchas sustancias químicas, y fue efectivo en el control de la germinación y crecimiento de patógenos en cacao. (M. Aneja, T. Gianfagna y P. Hebbar. *Trichoderma harzianum* produces nonanoic acid, an inhibitor of spore germination and mycelial growth of two cacao pathogens, *Physiological and Molecular Plant Pathology* 67:304-307, 2005).

5 El documento US2004/0266852 divulga un fungicida para usos agrícolas, compuesto de uno o más ácidos grasos y uno o más ácidos orgánicos diferentes del ácido graso. En la mezcla de los ácidos orgánicos con el ácido graso, el ácido orgánico actúa como un potente agente sinérgico para el ácido graso como un fungicida.

La patente de EEUU 5,366,995, divulga un método para erradicar infecciones fúngicas y bacterianas en plantas, y para mejorar la actividad de fungicidas y bactericidas en plantas, mediante ácidos grasos y sus derivados, con una
10 formulación que contiene 80% de ácido pelargónico o sus sales, para el control de hongos en plantas. Los ácidos grasos usados primariamente tienen cadenas de 9 a 18 carbonos.

La patente de EEUU 5,342,630 divulga un pesticida para usos en plantas, que contiene una sal inorgánica que mejora la eficacia de ácidos grasos con cadena de 8 a 22 carbonos. Uno de los ejemplos muestra un producto en polvo con 2% de ácido pelargónico, 2% de ácido cáprico, 80% de talco, 10% de carbonato de sodio y 5% de
15 carbonato de potasio.

La patente de EEUU 5,093,124 divulga un fungicida y artropodicida para plantas, que comprende ácidos monoalfacarboxílicos y sus sales, que tienen una fitotoxicidad reducida. Preferiblemente un fungicida con 9 a 10 carbonos en la cadena por lo menos, parcialmente neutralizado por metales alcalinos activos tales como potasio. La mezcla está compuesta de 40% de ingrediente activo disuelto en agua e incluye 10% de ácido pelargónico, 10%
20 de ácido cáprico y 20% ácidos grasos de coco, todos los cuales están neutralizados con hidróxido de potasio.

La patente de EEUU 6,596,763 divulga un método para controlar infecciones en la piel, que comprende ácidos grasos con 6 a 18 carbonos en la cadena, o sus derivados.

La patente de EEUU 6,103,768 y la patente de EEUU 6,136,856 divulgan la utilidad única de ácidos grasos y derivados, para erradicar infecciones fúngicas y bacterianas existentes en plantas. Este método no es preventivo pero mostró eficacia en infecciones establecidas. Sharpshooter, un producto disponible comercialmente, con 80%
25 de ácido pelargónico, 2% de emulsificante y 18% de surfactante mostró eficacia contra *Penicillium* y *Botrytis* spp.

La patente de EEUU 6,638,978 divulga un agente antimicrobiano conservante compuesto de un éster de glicerina y ácidos grasos, una mezcla binaria de ácidos grasos (cadenas de 6 a 18 carbonos) y un segundo ácido graso (cadenas de 6 a 18 carbonos) donde el segundo ácido graso es diferente del primer ácido graso, para la
30 preservación de alimentos.

El documento WO 01/97799 divulga el uso de ácidos grasos de cadena media como agentes antimicrobianos. Muestra que un incremento en el pH de 6.5 a 7.5 aumentó la MIC de los ácidos grasos de cadena corta que contienen cadenas de 6 - 8 carbonos.

El ácido pelargónico es usado como un componente en soluciones de desinfección de superficies en contacto con alimentos, en establecimientos para manipulación de alimentos. Un producto de EcoLab contiene 6.49% de ácido pelargónico como ingrediente activo para ser usado como un desinfectante para todas las superficies en contacto
35 con alimentos (12 CFR 178.1010 b).

La FDA ha dado dispensa al ácido pelargónico como un agente saborizante sintético para alimentos (21 CFR 172.515), como un adyuvante, ayuda de producción y desinfectante para ser usado en contacto con alimentos (12
40 CFR 178.1010 b) y en lavado para ayudar en el pelado con soda cáustica de frutas y vegetales (12 CFR 173.315).

El ácido pelargónico está en la lista del USDA bajo la lista de USDA de Authorized Substances, 1990, sección 5.14, Fruit and Vegetable Washing Compounds.

US-A-2003/0176500 divulga el uso de uno o más ácidos grasos de cadena media C₆-C₁₀ (MCFA) elegido de entre el grupo consistente en ácido caproico, ácido heptanoico, ácido caprílico, ácido nonanoico, y ácido cáprico, sales, derivados o mezclas o emulsiones de ellos, para la inhibición de la contaminación microbiana, crecimiento y la
45 subsiguiente producción de toxina.

Resumen de la invención

5 Un objeto de la invención es proporcionar una composición antibacteriana para extender la vida útil del agua, piensos e ingredientes de piensos, que comprenden: 1% a 99 % en peso de ácidos orgánicos en solución acuosa, que es una mezcla de C₂:C₉ o C₃:C₉ de ácidos orgánicos con un pH amortiguado a 1 - 5; 0 a 20% en peso de terpenos, y 0.5 - 10% de surfactantes; en el que la concentración de ácido C₉ es 2 a 20 % en peso, basado en el total del contenido de ácido orgánico.

10 Otro objeto de la invención es proporcionar un método para extender la vida útil de agua, piensos o ingredientes de piensos, que comprenden: tratamiento por atomización o mezcla con agua, piensos o ingredientes de piensos, de una cantidad efectiva de una composición que comprende 1% a 99 % en peso de ácidos orgánicos en solución acuosa, que es una mezcla C₂:C₉ o C₃:C₉ de amortiguadores de ácidos orgánicos con un pH amortiguado a 1 - 5; 0 a 20% en peso de terpenos, y 0.5 - 10% de surfactantes; en los que la concentración de ácido C₉ es 2 a 20 % en peso, basado en el total de contenido de ácido orgánico.

Descripción detallada de la invención

Definiciones:

15 Un "ácido orgánico" de la invención es un compuesto ácido carboxílico que tiene cadena hidrocarburo C₁ a C₁₈ recta o ramificada, por ejemplo ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico y ácido pelargónico.

Una "solución amortiguada" es una que resiste cambios en el pH cuando se añaden pequeñas cantidades de un ácido o una base. La capacidad amortiguadora es una medida cuantitativa de la resistencia de una solución amortiguadora a cambio de pH por adición de iones hidróxido. Los sistemas amortiguadores de la invención incluyen

20 HCl, citrato de sodio pH = 1 - 5

Ácido cítrico, citrato de sodio pH = 2.5 - 5.6

Ácido acético, acetato de sodio pH = 3.7 - 5.6

NH₄Cl, NH₄OH pH 1 a 11

25 Un "terpeno antimicrobiano" de la invención puede ser disulfuro de alilo, citral, pineno, nerol, geraniol, carvacrol, eugenol, carvona, anetol, alcanfor, mentol, limoneno, farnesol, caroteno, timol, borneol, mirceno, terpeneno, linalool, o mezclas de ellos. Son terpenos preferidos el disulfuro de alilo, timol, citral, eugenol, carvacrol, y carvona, o mezclas de ellos.

30 El término "cantidad efectiva" de un compuesto significa la cantidad que es capaz de ejecutar la función del compuesto o propiedad para la cual se expresa la cantidad efectiva, tal como una cantidad no tóxica pero suficiente para suministrar un efecto antimicrobiano. Así, una cantidad efectiva puede ser determinada por una persona de ordinaria destreza en la técnica, usando experimentos de rutina.

Las formulaciones pueden variar no sólo en la concentración de los componentes mayores, es decir ácidos orgánicos, sino también en el tipo de terpenos, tipo de surfactante y concentración de agua usados. La invención puede ser modificada mediante adición o eliminación de terpenos y surfactantes, de las formulaciones.

35 El término "efecto sinérgico" o "sinergia" significa un efecto conservante mejorado cuando los ingredientes son usados como una mezcla, comparado con el efecto aditivo esperado basado en cada componente usado sólo.

40 Las composiciones de la presente invención comprenden ácidos orgánicos que tienen 1 a 18 carbonos, que contienen una cantidad efectiva de una mezcla C₂:C₉ o una mezcla C₃:C₉, dando como resultado un efecto conservante sinérgico. En general, una solución acuosa de los ácidos grasos de cadena corta tiene un pH amortiguado entre 1 y 5, preferiblemente entre 1 y 3, entonces se añade el ácido C₉ (pelargónico) en una cantidad de 2 a 20 % en peso junto con los terpenos y surfactantes opcionales y otros aditivos.

45 En la invención pueden usarse terpenos, extractos de plantas o aceites esenciales que contienen terpenos antimicrobianos así como los terpenos más purificados. Los terpenos están comercialmente disponibles o pueden ser producidos por diferentes métodos conocidos en la técnica, tales como extracción por solvente o extracción/destilación por vapor o ser sintetizados por vía química.

El surfactante puede ser no iónico, catiónico o aniónico. Los ejemplos de surfactantes incluyen polisorbato 20, polisorbato 80, polisorbato 40, polisorbato 60, poligliceril ésteres, poligliceril monooleato, decagliceril monocaprilato, propilenglicol dicaprilato, trigliceril monoestearato, Tween^{MR} 20, Span^{MR} 20, Span^{MR} 40, Span^{MR} 60, Span^{MR} 80, surfactantes de aceite de ricino etoxilado o mezclas de ellos.

5 La composición total puede comprender 1% a 100% en peso de ácidos orgánicos, preferiblemente 20-95%. Del componente de ácido orgánico, 2% a 20% en peso es ácido pelargónico y el restante 98% a 80% en peso es ácido acético, ácido propiónico o una mezcla de ellos. La composición puede contener 0 a 20% en peso de terpenos, preferiblemente 0.5 - 10%, y 0 a 20% en peso de surfactante, preferiblemente 0.5 - 5%. La composición total puede contener 0 a 99 % en peso de agua.

10 La presente invención es efectiva contra cualquiera de estas clasificaciones de agentes infecciosos presentes en el agua, piensos e ingredientes mayores de piensos, en particular, bacterias, micoplasma, virus y hongos. Son ejemplos de estos agentes infecciosos *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus fumigatus*, *Mycoplasma iowae*, *Sclerotinia homeocarpa*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum graminicola*, *Penicillium sp.*, *Mycoplasma pneumoniae*, *E. coli*, *Salmonella sp.*, *Clostridia sp.*, *Campylobacter sp.* y otros. Las composiciones y métodos de la presente invención son efectivos en la prevención de muchas, si no todas, de estas infecciones en una gran variedad de sujetos, incluyendo humanos, otros mamíferos y aves.

15 La presente invención incluye un método para desinfectar agua, piensos e ingredientes de piensos. El método comprende la administración de la composición por una variedad de medios. Por ejemplo atomización sobre el pienso, atomización en el agua, mezcla con agua de beber, aplicación a superficies donde el agua y el pienso están almacenados para uso futuro o consumo diario, adición gota a gota a través de un dispositivo para aplicación de medicamentos estándar o desinfectante de agua, por ejemplo en casas de inicio, crecimiento o terminación de animales.

20 La composición de la presente invención puede ser usada con seguridad y de modo efectivo como un agente conservante para agua y pienso para todos los animales criados comercialmente, para consumo humano y uso externo, para animales de compañía y otros animales donde se desea una baja concentración microbiana en el suministro de pienso o agua.

A lo largo de este documento, se hace referencia a diferentes publicaciones. Las divulgaciones de estas publicaciones son incorporadas aquí en este documento, como referencia en su totalidad.

Ejemplo 1- Evaluación de ácidos orgánicos con pH amortiguado

30 Propósito: para determinar el efecto del pH en la actividad antimicrobiana de ácido acético y propiónico

Tratamientos:

1) Control (control negativo)

2) Ácido fórmico: Ácido propiónico (proporción 90:10; control negativo)

3) Ácido acético (pH 1)

35 4) Ácido acético (pH 2)

5) Ácido acético (pH 3)

6) Ácido acético (pH 4)

7) Ácido acético (pH 5)

8) Ácido acético (pH 6)

40 9) Ácido acético (pH 7)

10) Ácido propiónico (pH 1)

ES 2 575 217 T3

11) Ácido propiónico (pH 2)

12) Ácido propiónico (pH 3)

13) Ácido propiónico (pH 4)

14) Ácido propiónico (pH 5)

5 15) Ácido propiónico (pH 6)

16) Ácido propiónico (pH 7)

Procedimiento:

10 Se amortiguó el pH de ácidos propiónico y acético con hidróxido de amonio a valores de pH que variaban de 1 a 7. Los contenidos de ácido de las soluciones con pH amortiguado fueron determinados mediante un cálculo de relación peso a peso, para obtener el mismo contenido de ácido en las soluciones de prueba. Las soluciones son añadidas a agua estéril desionizada para suministrar una solución de 0.025%, 0.05%, 0.075% y 0.1% de ácido. Se registraron los valores de pH de las soluciones de agua desionizada y se anotó cualquier problema con la solubilidad.

15 A cada tubo de dilución se añadieron 100 ul de un cultivo del caldo nutritivo de Salmonella typhimurium (ATTC 14028). Después de la adición, los tubos fueron agitados en un aparato vortex y se dejó reposar. A 4 y 24 horas después de la adición del inóculo, se sembraron 100 ul de la solución en agar de recuento estándar (placas en triplicado). Se incubaron las placas a 37°C por 24 horas antes del recuento. Se determinó la dosificación efectiva mínima de cada ácido, mediante regresión lineal.

Resultados:

Tabla 1. Efecto de la amortiguación de pH en la Eficacia de Ácido Acético contra Salmonella					
Producto de Prueba	Conc. del Producto	Salmonella en el intervalo de tiempo			
		4 hr		24 hr	
		ufc/g	% de Reducción	ufc/g	% de Reducción
Control	N/A	1505	0	1180	0
Ácido fórmico : Ácido propiónico (90:10)	0.025	203	87	0	100
Ácido fórmico : Ácido propiónico (90:10)	0.05	50	97	0	100
Ácido fórmico : Ácido propiónico (90:10)	0.075	20	99	0	100
Ácido fórmico : Ácido propiónico (90:10)	0.1	3	100	0	100
Acético pH 1	0.025	883	41	107	91
Acético pH 1	0.05	750	50	7	99
Acético pH 1	0.075	617	59	17	99

ES 2 575 217 T3

Acético pH 1	0.1	520	65	7	99
Acético pH 2	0.025	920	39	170	86
Acético pH 2	0.05	817	46	50	96
Acético pH 2	0.075	673	55	20	98
Acético pH 2	0.1	670	55	17	99
Acético pH 3	0.025	1100	27	300	75
Acético pH 3	0.05	843	44	117	90
Acético pH 3	0.075	927	38	90	92
Acético pH 3	0.1	873	42	43	96
Acético pH 4	0.025	1067	29	543	54
Acético pH 4	0.05	1167	22	407	66
Acético pH 4	0.075	1097	27	263	78
Acético pH 4	0.1	1167	22	183	84
Acético pH 5	0.025	1267	16	993	16
Acético pH 5	0.05	1533	0	873	26
Acético pH 5	0.075	1367	9	805	32
Acético pH 5	0.1	1300	14	597	49
Acético pH 6	0.025	1500	0	1167	1
Acético pH 6	0.05	1767	0	1400	0
Acético pH 6	0.075	1667	0	1400	0
Acético pH 6	0.1	1633	0	1433	0
Acético pH 7	0.025	1567	0	1300	0
Acético pH 7	0.05	1600	0	1433	0
Acético pH 7	0.075	1467	2	1433	0
Acético pH 7	0.1	1567	0	1500	0

Tabla 2. Efecto de la amortiguación de pH en la Eficacia de Ácido Propiónico contra Salmonella

Producto de Prueba	Conc. de producto	Salmonella en el intervalo de tiempo	
		4 hr	24 hr

ES 2 575 217 T3

		ufc/g	% de Reducción	ufc/g	% de Reducción
Control	N/A	1505	0	1180	0
Producto de Prueba	Conc. de producto	ufc/g	% de Reducción	ufc/g	% de Reducción
Ácido fórmico : Ácido propiónico (90:10)	0.025	203	87	0	100
Ácido fórmico : Ácido propiónico (90:10)	0.05	50	97	0	100
Ácido fórmico : Ácido propiónico (90:10)	0.075	20	99	0	100
Ácido fórmico : Ácido propiónico (90:10)	0.1	3	100	0	100
Propiónico pH 1	0.025	1200	20	133	89
Propiónico pH 1	0.05	923	39	37	97
Propiónico pH 1	0.075	530	65	23	98
Propiónico pH 1	0.1	450	70	10	99
Propiónico pH 2	0.025	1067	29	70	94
Propiónico pH 2	0.05	733	51	10	99
Propiónico pH 2	0.075	477	68	13	99
Propiónico pH 2	0.1	380	75	7	99
Propiónico pH 3	0.025	1467	2	190	84
Propiónico pH 3	0.05	847	44	83	93
Propiónico pH 3	0.075	973	35	60	95
Propiónico pH 3	0.1	603	60	27	98
Propiónico pH 4	0.025	1367	9	615	48
Propiónico pH 4	0.05	1200	20	293	75
Propiónico pH 4	0.075	943	37	187	84
Propiónico pH 4	0.1	1167	22	163	86
Propiónico pH 5	0.025	>1505	0	793	33
Propiónico pH 5	0.05	1400	7	943	20

ES 2 575 217 T3

Propiónico pH 5	0.075	1167	22	630	47
Propiónico pH 5	0.1	817	46	557	53
Propiónico pH 6	0.025	>1505	0	1450	0
Propiónico pH 6	0.05	1400	7	1067	10
Propiónico pH 6	0.075	>1505	0	1233	0
Propiónico pH 6	0.1	1700	0	1333	0
Propiónico pH 7	0.025	>1505	0	1667	0
Propiónico pH 7	0.05	1700	0	1367	0
Propiónico pH 7	0.075	>1505	0	1700	0
Propiónico pH 7	0.1	1600	0	1367	0

Tabla 3. Concentraciones Mínimas inhibidoras		
Tratamiento	MIC en 4 Hr	MIC en 24 HR
Fórmico: Propiónico	0.067	<0.025
Acético, pH 1	0.129	0.065
Acético, pH 2	0.142	0.067
Acético, pH 3	0.176	0.073
Tratamiento	MIC en 4 Hr	MIC en 24 HR
Acético, pH 4	0.207	0.096
Acético, pH 5	0.238	0.210
Acético, pH 6	ND	ND
Acético, pH 7	ND	ND
Propiónico, pH 1	0.131	0.066
Propiónico, pH 2	0.120	0.064
Propiónico, pH 3	0.149	0.069
Propiónico, pH 4	0.237	0.091
Propiónico, pH 5	0.170	0.165
Propiónico, pH 6	ND	ND

Propiónico, pH 7	ND	ND
ND - MIC no pueden ser determinados debido a una falta de efecto en la rata de dosificación más alta.		

Conclusiones: La amortiguación de pH de ácido acético o ácido propiónico con amoníaco, disminuyó la eficacia del producto para Salmonella. El punto de equilibrio parece estar entre un pH de 3-4.

Ejemplo 2 – Evaluación de Ácidos Orgánicos Individuales

- 5 Propósito: Determinar el efecto de la longitud de la cadena de carbono de ácidos orgánicos sobre la actividad antimicrobiana.

Tratamientos:

- 1) Control
- 2) Ácido fórmico : Ácido propiónico (proporción 90:10; control positivo)
- 10 3) Ácido fórmico
- 4) Ácido acético
- 5) Ácido propiónico
- 6) Ácido butírico
- 7) Ácido valérico
- 15 8) Ácido caproico
- 9) Ácido enántico
- 10) Ácido caprílico
- 11) Ácido pelargónico
- 12) Ácido láurico
- 20 13) Hidróxido de potasio

Procedimiento:

25 En este experimento se evaluó el efecto de ácidos grasos libres. Varios ácidos grasos de cadena larga (caprílico, pelargónico y láurico) no eran solubles en agua y se usó KOH para llevar estos ácidos a solución en agua (la solución final contenía cantidades iguales en peso de ácido y KOH). El contenido de ácido de las soluciones fue determinado mediante un cálculo de la proporción peso a peso (peso de ácido/peso total de la solución con amortiguación de pH). Las soluciones fueron añadidas a agua desionizada estéril para suministrar soluciones 0.025%, 0.05%, 0.075% y 0.1% de ácido. Se registró el pH de las soluciones de agua desionizada y se anotó cualquier problema con la solubilidad.

30 A cada tubo de dilución se añadieron 100 ul de un cultivo del caldo nutritivo de Salmonella typhimurium (ATTC 14028). Después de la adición, los tubos fueron agitados en un aparato vortex y se dejó reposar. A 4 y 24 horas después de la adición del inóculo, se sembraron 100 ul de la solución en agar (placas en triplicado). Se incubaron las placas a 37°C por 24 horas antes del recuento. Se determinó la dosificación efectiva mínima de cada ácido, mediante regresión lineal

ES 2 575 217 T3

Tabla 4. Efecto de Ácidos Orgánicos contra Salmonella					
Producto de Prueba	Conc. de Producto	Salmonella en el Intervalo de tiempo			
		4 hr		24 hr	
		ufc/g	% de reducción	ufc/g	% de reducción
Control		1600	0	170 0	0
Ácido fórmico : Ácido propiónico (90:10)	0.025	160	90	0	100
Ácido fórmico : Ácido propiónico (90:10)	0.05	20	99	0	100
Ácido fórmico : Ácido propiónico (90:10)	0.075	0	100	0	100
Ácido fórmico : Ácido propiónico (90:10)	0.1	0	100	0	100
Ácido fórmico	0.025	83	95	0	100
Ácido fórmico	0.05	7	100	0	100
Ácido fórmico	0.075	0	100	0	100
Ácido fórmico	0.1	0	100	0	100
Ácido acético	0.025	917	43	80	95
Ácido acético	0.05	840	48	13	99
Ácido acético	0.075	677	58	10	99
Ácido acético	0.1	513	68	15	99
Ácido propiónico	0.025	1167	27	170	90
Ácido propiónico	0.05	900	44	40	98
Ácido propiónico	0.075	877	45	25	99
Ácido propiónico	0.1	773	52	30	98
Ácido butírico	0.025	1060	34	170	90
Ácido butírico	0.05	833	48	57	97
Ácido butírico	0.075	977	39	30	98
Ácido butírico	0.1	547	66	10	99
Ácido valérico	0.025	1233	23	533	69
Ácido valérico	0.05	1267	21	73	96
Ácido valérico	0.075	990	38	37	98
Ácido valérico	0.1	657	59	17	99
Ácido caproico	0.025	1267	21	30	98
Ácido caproico	0.05	1433	10	7	100
Ácido caproico	0.075	523	67	0	100
Ácido caproico	0.1	27	98	0	100
Ácido enántico	0.025	1103	31	10	99
Ácido enántico	0.05	0	100	0	100
Ácido enántico	0.075	0	100	0	100

ES 2 575 217 T3

Ácido enántico	0.1	0	100	0	100
Ácido caprílico / KOH	0.025	1567	2	1400	18
Ácido caprílico / KOH	0.05	1333	17	797	53
Ácido caprílico / KOH	0.075	1100	31	77	95
Ácido caprílico / KOH	0.1	0	100	0	100
Ácido pelargónico / KOH	0.025	7	100	0	100
Ácido pelargónico / KOH	0.05	0	100	0	100
Ácido pelargónico / KOH	0.075	0	100	0	100
Ácido pelargónico / KOH	0.1	0	100	0	100
Ácido láurico / KOH	0.025	670	58	20	99
Ácido láurico / KOH	0.05	0	100	0	100
Ácido láurico / KOH	0.075	0	100	0	100
Ácido láurico / KOH	0.1	0	100	0	100
KOH	0.025	0	100	0	100
KOH	0.05	0	100	0	100
KOH	0.075	0	100	0	100
KOH	0.1	0	100	0	100

Tabla 5. Concentración Inhibidora Mínima de Ácidos Orgánicos contra Salmonella

Tratamiento	MIC en 4 HR	MIC en 24 HR
Ácido fórmico : Ácido propiónico	0.065	<0.025
Ácido fórmico	0.064	<0.025
Ácido acético	0.129	0.064
Ácido propiónico	0.166	0.066
Ácido butírico	0.142	0.066
Ácido valérico	0.174	0.070
Ácido caproico	0.103	0.063
Ácido enántico	0.075	0.063
Ácido caprílico	0.109	0.090
Ácido pelargónico	0.063	<0.025
Ácido láurico	0.072	<0.025
Hidróxido de potasio	<0.025	<0.025

Conclusiones: Se observó que no hay relación directa entre la eficacia contra Salmonella y la longitud de la cadena de ácido orgánico. Esto contrasta con los efectos reportados para la longitud de cadena de ácido y eficacia contra los hongos. No se puede comparar la actividad de ácidos caprílico, pelargónico y láurico a los ácidos de cadena más corta debido al uso de KOH.

5 Ejemplo 3 – Mezclas de Ácidos Orgánicos con amortiguación de pH

Propósito: de los ácidos orgánicos de cadena larga, se observó que el pelargónico fue el más efectivo con base en estudios anteriores. Este experimento busca determinar si hay un efecto sinérgico cuando se combina un ácido propiónico o acético con amortiguación de pH, con ácido pelargónico.

Productos de prueba:

- 10 1) Control
- 2) Ácido fórmico: Ácido propiónico (relación 90:10, control positivo)
- 3) Ácido acético
- 4) Ácido acético: ácido pelargónico (80:20: peso/peso)
- 5) Ácido acético: ácido pelargónico (60:40: peso/peso)
- 15 6) Ácido acético: ácido pelargónico (40:60: peso/peso)
- 7) Ácido acético: ácido pelargónico (20:80: peso/peso)
- 8) Ácido propiónico
- 9) Ácido propiónico: ácido pelargónico (80:20: peso/peso)
- 10) Ácido propiónico: ácido pelargónico (60:40: peso/peso)
- 20 11) Ácido propiónico: ácido pelargónico (40:60: peso/peso)
- 12) Ácido propiónico: ácido pelargónico (20:80: peso/peso)
- 13) Ácido pelargónico

25 Procedimiento: Se amortiguó el pH de ácidos propiónico y acético con hidróxido de amonio a un pH de 3 y se combinaron con ácido pelargónico en las relaciones anteriores. Se determinó el contenido de ácido de las soluciones con pH amortiguado, mediante cálculo de relación peso a peso (peso de ácido/peso total de solución con pH amortiguado) y se ajustó para suministrar un valor ácido igual para cada tratamiento. Los tratamientos anteriores fueron añadidos a agua estéril desionizada para hacer soluciones de 0.025%, 0.05%, 0.075% y 0.1% de ácido. Se registraron los valores de pH de las soluciones de agua desionizada y se anotó cualquier problema con la solubilidad.

30 A cada tubo de dilución se añadieron 100 ul de un cultivo del caldo nutritivo de Salmonella typhimurium (ATTC 14028). Después de la adición, los tubos fueron agitados en un aparato vortex y se dejó reposar. A 4 y 24 horas después de la adición del inóculo, se sembraron 100 ul de la solución en agar de recuento estándar (placas en triplicado). Se incubaron las placas a 37°C por 24 horas antes del recuento. Se determinó la dosificación efectiva mínima de cada ácido, mediante regresión lineal

35

ES 2 575 217 T3

Tabla 6. Efecto de ácido Pelargónico en la eficacia de acético o propiónico contra Salmonella					
Producto de Prueba	Conc. del Producto	Salmonella en el tiempo del Intervalo			
		4 hr		24 hr	
		ufc/g	% de Reducción	ufc/g	% de Reducción
Control	N/A	1517	0	1344	0
Ácido fórmico : Ácido propiónico (90:10)	0.025	200	87	0	100
	0.05	67	96	0	100
	0.075	20	99	2	100
	0.1	10	99	0	100
100% Propiónico pH 3	0.025	1133	25	70	95
	0.05	880	42	17	99
	0.075	1133	25	20	99
	0.1	857	44	13	99
80% Propiónico pH 3: 20% Pelargónico	0.025	0	100	3	100
	0.05	0	100	0	100
	0.075	0	100	3	100
	0.1	0	100	0	100
60% Propiónico pH 3: 40% Pelargónico	0.025	0	100	0	100
	0.05	0	100	0	100
	0.075	0	100	3	100
	0.1	0	100	0	100
40% Propiónico pH 3: 60% Pelargónico	0.025	0	100	0	100
	0.05	0	100	0	100
	0.075	0	100	3	100
	0.1	0	100	0	100

ES 2 575 217 T3

20% Propiónico pH 3: 80% Pelargónico	0.025	0	100	0	100
	0.05	0	100	0	100
	0.075	0	100	3	100
	0.1	0	100	0	100
100% Acético pH 3	0.025	943	38	123	92
	0.05	1007	34	120	92
	0.075	1007	34	77	95
	0.1	967	36	83	95
80% Acético pH 3: 20% Pelargónico	0.025	0	100	0	100
	0.05	0	100	0	100
	0.075	0	100	3	100
	0.1	0	100	0	100
60% Acético pH 3: 40% Pelargónico	0.025	0	100	0	100
	0.05	0	100	0	100
	0.075	0	100	3	100
	0.1	0	100	0	100
40% Acético pH 3: 60% Pelargónico	0.025	0	100	0	100
	0.05	0	100	0	100
	0.075	0	100	3	100
	0.1	0	100	0	100
20% Acético pH 3: 80% Pelargónico	0.025	0	100	0	100
	0.05	0	100	0	100
	0.075	0	100	0	100
	0.1	0	100	0	100
Pelargónico	0.025	0	100	0	100

	0.05	0	100	0	100
	0.075	0	100	0	100
	0.1	0	100	0	100

Tabla 7. Concentración Inhibidora Mínima de Pelargónico cuando se mezcla con ácidos acético o propiónico		
Tratamiento	MIC en 4 HR	MIC en24 HR
Ácido fórmico : Ácido propiónico	0.067	<0.025
Ácido propiónico	0.179	0.064
Ácido propiónico: ácido pelargónico (80:20)	<0.025	0.063
Tratamiento	MIC en 4 HR	MIC en24 HR
Ácido propiónico: ácido pelargónico (60:40)	<0.025	<0.025
Ácido propiónico: ácido pelargónico (40:60)	<0.025	<0.025
Ácido propiónico: ácido pelargónico (20:80)	<0.025	<0.025
Ácido acético	0.171	0.068
Ácido acético: ácido pelargónico (80:20)	<0.025	<0.025
Ácido acético: ácido pelargónico (60:40)	<0.025	<0.025
Ácido acético: ácido pelargónico (40:60)	<0.025	<0.025
Ácido acético: ácido pelargónico (20:80)	<0.025	<0.025
Ácido pelargónico	<0.025	<0.025

Conclusión: La adición de ácido pelargónico a propiónico o ácido acético, dio como resultado un aumento en eficacia.

5 Estudio 4

Se amortiguó el pH de ácidos propiónico y acético con hidróxido de amonio a un valor de 3 y se combinaron con pelargónico en las relaciones listadas. Se determinó el contenido ácido de las soluciones con pH amortiguado, mediante cálculo de la relación peso a peso (peso de ácido/peso total de solución con pH amortiguado) y se ajustó para suministrar un valor ácido igual para cada tratamiento. Los tratamientos anteriores fueron añadidos a agua estéril desionizada para hacer soluciones de 0.025% y 0.05% de ácido total. Se registraron los valores de pH de las soluciones de agua desionizada y se anotó cualquier problema con la solubilidad.

ES 2 575 217 T3

A cada tubo de dilución se añadieron 100 ul de un cultivo del caldo nutritivo de Salmonella typhimurium (ATTC 14028). Después de la adición, los tubos fueron agitados en un aparato vortex y se dejó reposar. A 4 y 24 horas después de la adición del inóculo, se sembraron 100 ul de la solución en agar de placa estándar (placas en triplicado). Se incubaron las placas a 37°C por 24 horas antes del recuento.

Tabla 8. Efecto de ácido Pelargónico en la eficacia de acético o propiónico contra Salmonella					
Producto de pueba	Concentración del producto	Salmonella en el Intervalo de tiempo			
		4 hr		24 hr	
		(ufc/g)	% de reducción	(ufc/g)	% de reducción
Ácido fórmico : ácido Propiónico (90:10)	0.025	600	57	<10	100
	0.05	170	88	<10	100
100% Propiónico pH 3	0.025	990	29	130	91
	0.05	1000	29	50	96
99% Propiónico pH 3: 1% Pelargónico	0.025	1100	21	100	93
	0.05	620	56	<10	100
98% Propiónico pH 3: 2% Pelargónico	0.025	1100	21	60	96
	0.05	560	60	<10	100
95% Propiónico pH 3: 5% Pelargónico	0.025	780	44	<10	100
	0.05	50	96	<10	100
90% Propiónico pH 3: 10% Pelargónico	0.025	220	84	<10	100
	0.05	<10	100	<10	100
80% Propiónico pH 3: 20% Pelargónico	0.025	<10	100	<10	100
	0.05	<10	100	<10	100
100% Acético pH 3	0.025	1000	29	60	96
	0.05	950	32	20	99
99% Acético pH 3: 1% Pelargónico	0.025	1200	14	90	94
	0.05	820	41	<10	100

ES 2 575 217 T3

98% Acético pH 3: 2% Pelargónico	0.025	1100	21	40	97
	0.05	710	49	<10	100
95% Acético pH 3: 5% Pelargónico	0.025	690	51	<10	100
	0.05	40	97	<10	100
90% Acético pH 3: 10% Pelargónico	0.025	280	80	<10	100
	0.05	<10	100	<10	100
80% Acético pH 3: 20% Pelargónico	0.025	<10	100	<10	100
	0.05	<10	100	<10	100
Control		1400		1400	

Conclusión: La adición de ácido pelargónico (1 - 20%) a ácidos propiónico o acético, dio como resultado un aumento en eficacia contra salmonella.

Estudio 5

- 5 Se añadieron a agua estéril desionizada ácidos propiónico, acético y pelargónico por sí mismos o en combinación como se listó, para hacer soluciones de 0.05%, 0.04%, 0.03%, 0.02% y 0.01% de ácido total. Se registraron los valores de pH de las soluciones de agua desionizada y se anotó cualquier problema con la solubilidad. A cada tubo de dilución se añadieron 100 ul de un caldo de cultivo nutriente de Salmonella typhimurium (ATTC 14028). Después de la adición se agitaron los tubos en un aparato Vortex y se dejó en reposo. A 24 horas después de la adición del inóculo, se sembraron 100 ul de la solución sobre agar de placa estándar (placas en triplicado). Se incubaron las placas a 37°C por 24 horas antes del recuento.

Producto de Prueba (%)	Salmonella 24 hr después del tratamiento (ufc/g)				
	0.05	0.04	0.03	0.02	0.01
Ácido fórmico : Ácido propiónico(90:10)	0	10	20	60	500
Ácido pelargónico	850	1500	UD	1300	1400
Producto de Prueba (%)	0.05	0.04	0.03	0.02	0.01
Ácido propiónico	560	910	810	870	1200
Ácido acético	1100	1100	UD	1100	UD
Prop/Pelargónico (95/5)	0	30	240	360	1400
Acético/Pelargónico (95/5)	20	130	UD	940	1100

ES 2 575 217 T3

Control	1400			
NPD= No es Posible Determinar				

Conclusión: la prueba mostro aumento en la eficacia por mezcla de Propiónico/Pelargónico (95/5) y Acético/Pelargónico (95/5), 24 horas después del tratamiento.

Estudio 6

- 5 Se probó ácido cáprico (5%, 10% o 20%) diluido en ácido acético o ácido propiónico para determinar su eficacia contra salmonella en pienso.

Se trató pienso comercial para aves de corral modificado con Salmonella typhimurium (ATTC 14028), con 1 o 3 kg/TM de las soluciones listadas abajo. 24 horas después del tratamiento, se añadieron 10 gr de pienso a 90 ml de solución amortiguadora Butterfield, se mezcló y entonces se inocularon 100 ul de la solución sobre agar de placa estándar (placas en triplicado). Se incubaron las placas a 37°C por 24 horas antes del recuento.

10

Tabla 10. Efecto de ácidos Cáprico/Acético contra Salmonella en pienso.		
Tratamiento	ufc/g	% de Reducción
Control	5733	
Tratamiento	ufc/g	% de Reducción
Fórmico:Acético (1 kg/ton)	17	99.7
Ácido acético (1 kg/ton)	3367	41.3
Ácido acético (3 kg/ton)	2600	54.6
5% Cáprico en Ácido acético (1 kg/ton)	3200	44.2
5% Cáprico en Ácido acético (3 kg/ton)	3733	34.9
10% Cáprico en Ácido acético (1 kg/ton)	3233	43.6
10% Cáprico en Ácido acético (3 kg/ton)	2900	49.4
20% Cáprico en Ácido acético (1 kg/ton)	3200	44.2
20% Cáprico en Ácido acético (3 kg/ton)	4500	21.5

Tabla 11. Efecto de ácidos Cáprico/Acético contra Salmonella en pienso.		
Tratamiento	ufc/g	% de Reducción

ES 2 575 217 T3

Control	4500	
Fórmico : Prop 1 kg/ton	4100	8.9
Fórmico : Prop 3 kg/ton	2067	54.1
Ácido prop 1 kg/ton	4633	0
Ácido prop 3 kg/ton	5633	0
5% Cáprico en ácido propiónico 1 kg/ton	3233	28.2
5% Cáprico en ácido propiónico 3 kg/ton	3400	24.4
10% Cáprico en ácido propiónico 1 kg/ton	2367	47.4
10% Cáprico en ácido propiónico 3 kg/ton	4033	10.4
20% Cáprico en ácido propiónico 1 kg/ton	4067	9.6
20% Cáprico en ácido propiónico 3 kg/ton	3700	17.8

La adición de ácido cáprico a ácido acético o ácido propiónico en concentraciones de 5-20%, no pareció mejorar de manera significativa la eficacia del ácido orgánico contra Salmonella en pienso.

Estudio 7

- 5 Se probó ácido mirístico (5%, 10% y 20%), diluido en ácido propiónico para determinar su eficacia contra salmonella en pienso. El ácido mirístico no fue soluble en ácido acético.

Se trató pienso comercial para aves de corral modificado con Salmonella typhimurium (ATTC 14028), con 1 o 3 kg/TM de las soluciones listadas abajo. 24 horas después del tratamiento, se añadieron 10 gr de pienso a 90 ml de solución amortiguadora Butterfield, se mezcló y entonces se inocularon 100 ul de la solución sobre agar de placa estándar (placas en triplicado). Se incubaron las placas a 37°C por 24 horas antes del recuento

10

Tratamiento	ufc/g	% de Reducción
Control	40000	-
Fórmico : Prop 1 kg/TM	23533	41.17
Fórmico : Prop 3 kg/TM	7167	82.08
Ácido prop 1 kg/TM	3967	90.08
Ácido prop 3 kg/TM	233	99.42
5% Mirístico en ácido propiónico 1 kg/TM	7767	80.58
5% Mirístico en ácido propiónico 3 kg/TM	1500	69.25
10% Mirístico en ácido propiónico 1	22567	43.58

ES 2 575 217 T3

kg/TM		
10% Mirístico en ácido propiónico 3 kg/TM	23333	41.67
20% Mirístico en ácido propiónico 1 kg/TM	22667	43.33
20% Mirístico en ácido propiónico 3 kg/TM	22967	42.58

No se observó efecto benéfico en la eficacia cuando se adicione ácido mirístico en 5-20% a ácido propiónico, comparado con la combinación estándar de ácido propiónico.

Estudio 8

- 5 Se probó ácido láurico (5%, 10%, 20%) diluido con ácido propiónico para determinar su eficacia contra salmonella en pienso.

Se trató pienso comercial para aves de corral modificado con *Salmonella typhimurium* (ATTC 14028), con 1 o 2 kg/TM de las soluciones listadas abajo. 24 horas después del tratamiento, se añadieron 10 gr de pienso a 90 ml de solución amortiguadora Butterfield, se mezcló y entonces se inocularon 100 ul de la solución sobre agar de placa estándar (placas en triplicado). Se incubaron las placas a 37°C por 24 horas antes del recuento

10

Tratamiento	ufc/g	% de Reducción
Control	33333	-
Fórmico: Prop 1 kg/TM	24633	26.1
Fórmico: Prop 3 kg/TM	10500	68.5
Ácido prop 1 kg/TM	2567	92.3
Ácido prop 3 kg/TM	0	100.0
5% Láurico en ácido propiónico 1 kg/TM	8767	73.7
5% Láurico en ácido propiónico 3 kg/TM	433	98.7
10% Láurico en ácido propiónico 1 kg/TM	7800	76.6
10% Láurico en ácido propiónico 3 kg/TM	833	97.5
20% Láurico en ácido propiónico 1 kg/TM	9100	72.7
20% Láurico en ácido propiónico 3 kg/TM	2333	93.0

No se observó efecto benéfico cuando se adicione ácido láurico (5-20%) a ácido propiónico, comparado con la combinación estándar de ácido propiónico.

Reivindicaciones

1. Una composición antimicrobiana para extender la vida útil de agua, piensos o ingredientes de piensos, que comprende:
 - 5 1% a 99 % en peso de ácidos orgánicos en solución acuosa, que es una mezcla de C₂:C₉ o C₃:C₉ de ácidos orgánicos, con un pH amortiguado para pH = 1 - 5,
 - 0 a 20% en peso de terpenos, y
 - 10 0.5 - 10% de surfactantes

en la que la concentración de ácido C₉ es 2 a 20 % en peso, basado en el total del contenido de ácido orgánico.
- 15 2. La composición antimicrobiana de la reivindicación 1, que tiene un pH amortiguado en 1-3.
3. La composición antimicrobiana de la reivindicación 1, en la que el surfactante es polisorbato 20, polisorbato 80, polisorbato 40, polisorbato 60, poligliceril éster, poligliceril monooleato, decagliceril monocaprilato, propilenglicol dicaprilato, triglicerol monoestearato, Tween™ 20, Span™ 20, Span™ 40, Span™ 60, Span™ 80, surfactantes de aceite de ricino etoxilados o mezclas de los mismos.
- 20 4. La composición antimicrobiana de la reivindicación 1, en la que la concentración del surfactante es 0.5 a 5 % en peso.
5. La composición antimicrobiana de la reivindicación 1, en la que se selecciona el terpeno del grupo que consiste en disulfuro de alilo, citral, pineno, nerol , geraniol, carvacrol , eugenol, carvona , anetol, alcanfor, mentol, limoneno, farnesol, caroteno, timol, borneol, mirceno, terpeneno, linalool, o mezclas de los mismos.
- 25 6. La composición antimicrobiana de la reivindicación 1, en la que se selecciona el terpeno del grupo consiste en disulfuro de alilo, timol, citral, eugenol, carvacrol, y carvona, o mezclas de los mismos.
- 30 7. La composición antimicrobiana de la reivindicación 1, en la que el contenido de terpeno es 0.5 - 10 % en peso.
8. Un método para extender la vida útil del agua, piensos o ingredientes de piensos, que comprende:
 - 35 tratamiento con aerosol o mezcla de agua, piensos o ingredientes de piensos, con una cantidad efectiva de una composición que comprende 1% a 99 % en peso de ácidos orgánicos en solución acuosa, que es una mezcla de C₂:C₉ o C₃:C₉ de ácidos orgánicos, con el pH amortiguado para un pH = 1 - 5;
 - 40 0 a 20% en peso de terpenos, y 0.5 - 10% de surfactantes;
 - en los que la concentración de ácido C₉ es 2 a 20 % en peso, basado en el total del contenido de ácido orgánico.
9. El método de la reivindicación 8, en el que la composición tiene un pH amortiguado de 1 – 3.
- 45 10. El método de la reivindicación 8, en el que el surfactante es polisorbato 20, polisorbato 80, polisorbato 40, polisorbato 60, poligliceril éster, poligliceril monooleato, decagliceril monocaprilato, propilenglicol dicaprilato, triglicerol monostearato, Tween™ 20, Span™ 20, Span™ 40, Span™ 60, Span™ 80, surfactantes de aceite de ricino etoxilados o mezclas de los mismos.
- 50 11. El método de la reivindicación 8, en el que la concentración de surfactante es 0.5 a 5 % en peso.

12. El método de la reivindicación 8, en el que el terpeno se selecciona del grupo que consiste de disulfuro de alilo, citral, pineno, nerol, geraniol, carvacrol, eugenol, carvona, anetol, alcanfor, mentol, limoneno, farnesol, caroteno, timol, borneol, mirceno, terpeneno, linalool, o mezclas de los mismos.
- 5 13. El método de la reivindicación 8, en el que el terpeno se selecciona del grupo que consiste en disulfuro alilo, timol, citral, eugenol, carvacrol y carvona, o mezclas de los mismos.
14. El método de la reivindicación 8, en el que el contenido de terpeno es 0.5 - 10 % en peso.
- 10 15. El método de la reivindicación 8, en el que la composición es efectiva contra bacterias, virus, micoplasmas u hongos presentes en el agua para beber, piensos e ingredientes de piensos.