

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 600 312**

51 Int. Cl.:

**A23K 40/25** (2006.01)

**A23K 50/42** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.08.2011 PCT/US2011/046422**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.02.2012 WO12018913**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2011 E 11745645 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 2597963**

54 Título: **Composiciones de alimento para mascotas que tienen actividad antimicrobiana**

30 Prioridad:

**03.08.2010 US 370328 P**

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

**08.02.2017**

73 Titular/es:

**HILL'S PET NUTRITION, INC. (100.0%)  
400 Southwest 8th Street  
Topeka, KS 66603, US**

72 Inventor/es:

**MONTELONGO, LUIS J.;  
POPE, BRENT K. y  
MARTINEZ, SARAH B.**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 600 312 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

Composiciones de alimento para mascotas que tienen actividad antimicrobiana

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a nuevas composiciones de alimento, particularmente a composiciones de alimento para mascotas, que son resistentes a la contaminación microbiana, y a métodos para producir las mismas.

Antecedentes de la invención

10 Las composiciones de alimento, particularmente las composiciones de alimento para mascotas, están sometidas a contaminación microbiana, particularmente bacteriana, por patógenos tales como *Salmonella*, *Listeria*, *E. coli* y *Clostridium*. Se ha demostrado que resulta difícil encontrar agentes antimicrobianos eficaces para este fin, ya que es necesario que los agentes sean seguros, agradables al paladar, rentables y estables, así como eficaces. En particular, las composiciones de alimento seco para mascotas son susceptibles a la contaminación microbiana en la fase posterior al procesamiento.

15 Pueden usarse numerosos agentes antimicrobianos químicos o naturales para combatir bacterias, mohos y levaduras en alimentos. Los agentes antimicrobianos químicos usados frecuentemente en la industria alimentaria son ácido fosfórico, ácido propiónico y propionatos, sulfitos, ácido benzoico y benzoatos, nitritos, nitratos y parabenos. Los agentes de palatabilidad usados en la industria de alimentos para mascotas también podrían ser de naturaleza antimicrobiana debido a su pH ácido (~2-3).

20 Se ha notificado que el ácido propiónico inhibe el crecimiento de *Salmonella*. También se ha identificado que el ácido fosfórico tiene actividad antimicrobiana. Basándose en el pH, el ácido propiónico tiene la mayor actividad antimicrobiana seguido por ácido láctico, acético, cítrico, fosfórico y clorhídrico.

25 Se conoce que el ácido láctico tiene propiedades antimicrobianas a mayores niveles, pero debido a su alta acidez, se proporciona habitualmente en forma de sal, por ejemplo, como lactato de sodio, potasio o calcio. Los niveles de ácido láctico en composiciones de alimento para animales de compañía son generalmente bastante bajos, por ejemplo, inferiores al 1%. A veces se considera que las bacterias del ácido láctico son un probiótico, porque al proporcionar ácido láctico favorecen el crecimiento de determinadas bacterias que producen y son tolerantes al ácido láctico, tales como *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Bifidobacterium*, que se piensa que confieren beneficios para la salud, por ejemplo, reducción de la intolerancia a la lactosa, reducción del riesgo de cáncer de colon, disminución del colesterol, mejora de la función inmunitaria y reducción de la incidencia de diarrea asociada a antibióticos.

Sumario de la invención

30 A partir de la descripción detallada proporcionada a continuación en el presente documento serán evidentes áreas de aplicabilidad adicionales de la presente invención. Debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican la realización preferida de la invención, se pretende que tengan fines de ilustración sólo y no se pretende que limiten el alcance de la invención.

35 Después de una selección y optimización extensivas, se ha encontrado que composiciones de alimento para mascotas que tienen ácidos inorgánicos, ácidos orgánicos, agentes antimicrobianos naturales, aromas, agentes de palatabilidad, fenoles, productos fermentados, orégano, aminoácidos, ácidos grasos y mezclas de los mismos mostraron un retraso del crecimiento de microbios incluyendo bacterias patógenas tales como bacterias gram-negativas o gram-positivas o bacterias de las especies de *Salmonella* y microorganismos de descomposición incluyendo levaduras y mohos, en composiciones de alimento para mascotas.

40 En un aspecto, la presente invención proporciona un uso de ácido láctico para conferir actividad antimicrobiana frente a *Salmonella* en una composición de alimento seco para gatos o en una composición de alimento seco para perros, en el que el ácido láctico está presente en la composición en una cantidad de desde el 0,1% hasta el 3%.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir una composición de alimento para mascotas que tiene actividad antimicrobiana frente a *Salmonella*, que comprende las siguientes etapas:

45 a. precondicionar mezclando componentes húmedos y secos a temperatura elevada para formar una masa de croqueta;

b. extruir la masa de croqueta a alta temperatura y presión;

c. secar la croqueta extruida; y

d. recubrir la croqueta seca con componentes secos y/o líquidos tópicos;

en el que se aplica a la croqueta un componente que confiere un efecto antimicrobiano sobre la composición en la etapa a y/o d en una cantidad del 0,1% al 3% en peso de la composición,

5 en el que el componente antimicrobiano tiene actividad frente a *Salmonella*, la composición es un alimento seco para gatos o alimento seco para perros, y en el que el componente es ácido láctico.

10 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método de inhibición del crecimiento microbiano en una composición de alimento para mascotas que comprende añadir un componente en una cantidad eficaz para conferir un efecto antimicrobiano a la composición, en el que el componente está en la composición en del 0,1% en peso al 3% en peso, la composición es un alimento seco para gatos o un alimento seco para perros y en el que el componente es ácido láctico.

La presente descripción abarca composiciones de alimento, particularmente composiciones de alimento para mascotas, que comprenden un componente en una cantidad eficaz para conferir un efecto antimicrobiano.

15 En un aspecto, el componente tiene actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas y microorganismos de descomposición incluyendo levaduras y mohos. El patógeno puede ser una bacteria gram-negativa o gram-positiva, o *Salmonella* (*S. aarhus*, *S. muenster* *El* y *S. worthington*), *Listeria*, *E. coli* o *Clostridium*, o mezclas de las mismas.

En otro aspecto, el componente se selecciona del grupo que comprende ácidos inorgánicos, ácidos orgánicos, agentes antimicrobianos naturales, aromas, agentes de palatabilidad, fenoles, productos fermentados, orégano, aminoácidos, ácidos grasos y mezclas de los mismos.

20 En otro aspecto, el ácido orgánico es ácido láctico.

Los documentos US2004/0156884, US 3.962.462 y WO 2006/004481 dan a conocer composiciones de alimento estables frente a agentes microbianos.

Breve descripción de los dibujos

25 La presente invención se entenderá con más detalle a partir de la descripción detallada y los dibujos adjuntos, en los que:

Figura 1. Alimento seco canino con ácido láctico añadido al preacondicionador e incubado a 30°C.

Figura 2. Alimento seco canino con ácido láctico añadido de manera tópica e incubado a 30°C.

Figura 3. Alimento seco canino con ácido propiónico añadido al preacondicionador e incubado a 30°C.

Figura 4. Alimento seco canino con ácido propiónico añadido de manera tópica e incubado a 30°C.

30 Figura 5. Alimento seco canino con un fenol que tiene un pH de 2-2,5 añadido al preacondicionador e incubado a 30°C.

Figura 6. Alimento seco canino con un fenol que tiene un pH de 2-2,5 añadido de manera tópica e incubado a 30°C.

Figura 7. Alimento seco canino con arginato láurico añadido al preacondicionador e incubado a 30°C.

Figura 8. Alimento seco canino con arginato láurico añadido de manera tópica e incubado a 30°C.

35 Figura 9. Alimento seco canino con ácido propiónico añadido de manera tópica e incubado a 30°C (punto de contaminación: producto terminado).

Figura 10. Alimento seco canino con ácido propiónico añadido al preacondicionador e incubado a 30°C (punto de contaminación: producto terminado).

40 Figura 11. Alimento seco canino con ácido propiónico añadido de manera tópica/al preacondicionador e incubado a 30°C (punto de contaminación: producto terminado).

Figura 12. Alimento seco canino con ácido propiónico añadido de manera tópica y recubierto e incubado a 30°C (punto de contaminación: croqueta antes de la envoltura).

Figura 13. Alimento seco canino con ácido propiónico añadido al preacondicionador y recubierto e incubado a 30°C (punto de contaminación: croqueta antes de la envoltura).

5 Figura 14. Alimento seco canino con ácido propiónico añadido de manera tópica/al preacondicionador y recubierto e incubado a 30°C (punto de contaminación: croqueta antes de la envoltura).

Figura 15. Alimento seco canino con ácido propiónico añadido al preacondicionador e incubado a 70°C (punto de contaminación: elevador neumático).

10 Figura 16. Alimento seco canino con ácido propiónico añadido al preacondicionador e incubado a 50°C (punto de contaminación: entrada en la secadora).

Figura 17. Alimento seco canino con ácido propiónico añadido al preacondicionador e incubado a 70°C (empieza a aumentar la temperatura).

Figura 18. Alimento seco canino con ácido propiónico añadido al preacondicionador e incubado a 50°C (punto de contaminación: enfriamiento por evaporación).

15 Figura 19. Alimento seco canino con ácido láctico añadido de manera tópica e incubado a 30°C (punto de contaminación: producto terminado).

Figura 20. Alimento seco canino con ácido láctico añadido al preacondicionador e incubado a 30°C (punto de contaminación: producto terminado).

20 Figura 21. Alimento seco canino con ácido láctico añadido de manera tópica/al preacondicionador e incubado a 30°C (punto de contaminación: producto terminado).

Figura 22. Alimento seco canino con ácido láctico añadido de manera tópica y recubierto e incubado a 30°C (punto de contaminación: croqueta antes de la envoltura).

Figura 23. Alimento seco canino con ácido láctico añadido al preacondicionador y recubierto e incubado a 30°C (punto de contaminación: croqueta antes de la envoltura).

25 Figura 24. Alimento seco canino con ácido láctico añadido de manera tópica/al preacondicionador y recubierto e incubado a 30°C (punto de contaminación: croqueta antes de la envoltura).

Figura 25. Alimento seco canino con ácido láctico añadido al preacondicionador e incubado a 70°C (punto de contaminación: elevador neumático).

30 Figura 26. Alimento seco canino con ácido láctico añadido al preacondicionador e incubado a 50°C (punto de contaminación: entrada en la secadora).

Figura 27. Alimento seco canino con ácido láctico añadido al preacondicionador e incubado a 70°C (empieza a aumentar la temperatura).

Figura 28. Alimento seco canino con ácido láctico añadido al preacondicionador e incubado a 50°C (punto de contaminación: enfriamiento por evaporación).

35 Descripción detallada de la invención

La siguiente descripción de la(s) realización/realizaciones preferida(s) es de naturaleza meramente a modo de ejemplo y no se pretende que limite la invención, su aplicación, o usos en modo alguno.

40 La presente descripción abarca composiciones de alimento, particularmente composiciones de alimento para mascotas, que comprenden un componente en una cantidad eficaz para conferir un efecto antimicrobiano a la composición.

En un aspecto, el componente tiene actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas y microorganismos de descomposición incluyendo levaduras y mohos. El patógeno puede ser una bacteria gram-negativa o gram-positiva, o *Salmonella*, *Listeria*, *E. coli* o *Clostridium*, o mezclas de las mismas.

## ES 2 600 312 T3

En otro aspecto, el componente se selecciona del grupo que comprende ácidos inorgánicos, ácidos orgánicos, agentes antimicrobianos naturales, aromas, agentes de palatabilidad, fenoles, productos fermentados, orégano, aminoácidos, ácidos grasos y mezclas de los mismos.

Los ácidos inorgánicos de la presente descripción comprenden ácido fosfórico.

- 5 Los ácidos orgánicos de la presente descripción comprenden lactato de sodio, diacetato de sodio, lactato de potasio, ácido láctico, arginato láurico, ácido propiónico, propionato de calcio, propionato de sodio, propionato de zinc, ácido acético, ácido cítrico, ácido málico, ácido fumárico, ácido adípico, ácido succínico, ácido tartárico, y mezclas de los mismos.

- 10 Los agentes antimicrobianos naturales de la presente descripción comprenden agentes lacto-antimicrobianos (lactoferrina, lactoperoxidasa, lactoglobulinas y lactolípidos), agentes ovo-antimicrobianos (lisozima, ovotransferrina, ovoglobulina IgY y avidina), agentes fito-antimicrobianos (fito-fenoles, saponinas, flavonoides, tiosulfatos, catequinas, glucosinolatos y agar), agentes bacto-antimicrobianos (probióticos, nisina, pediocina y reuterina) y mezclas de los mismos.

- 15 Los fenoles comprenden aquellos que tienen un pH de aproximadamente 2, aproximadamente 2,5, aproximadamente 3, aproximadamente 3,5, aproximadamente 4, aproximadamente 4,5, aproximadamente 4,8, aproximadamente 5, aproximadamente 5,5, aproximadamente 6.

Los productos fermentados de la presente descripción comprenden dextrosa en cultivo.

En la presente invención, se usa ácido láctico para conferir actividad antimicrobiana frente a *Salmonella* en una composición de alimento seco para perros o en una composición de alimento seco para gatos.

- 20 El ácido láctico está presente en la composición en una cantidad de aproximadamente el 0,1%, aproximadamente el 0,13%, aproximadamente el 0,15%, aproximadamente el 0,2%, aproximadamente el 0,25%, aproximadamente el 0,3%, aproximadamente el 0,4%, aproximadamente el 0,5%, aproximadamente el 1%, aproximadamente el 2%, aproximadamente el 3%, desde aproximadamente el 0,1% hasta aproximadamente el 3%, en peso.

En una realización, el pH de la composición es menor de 5,5.

- 25 La presente invención también abarca métodos de producción de composiciones de alimento que tienen actividad antimicrobiana y específicamente, que tienen actividad antimicrobiana frente a *Salmonella*. El método para producir una composición de alimento para mascotas comprende las siguientes etapas:

- a. precondicionar mezclando componentes húmedos y secos a temperatura elevada para formar una masa de croqueta;
- 30 b. extruir la masa de croqueta a alta temperatura y presión;
- c. secar la croqueta extruida; y
- d. recubrir la croqueta seca con componentes secos y/o líquidos tópicos;

- 35 en el que se aplica a la croqueta un componente que confiere un efecto antimicrobiano a la composición en la etapa a y/o d, en una cantidad de desde aproximadamente el 0,1% hasta aproximadamente el 3% en peso de la croqueta, en el que el componente tiene actividad antimicrobiana frente a *Salmonella*, en el que la composición es un alimento seco para gatos o un alimento seco para perros, y en el que el componente es ácido láctico.

En otra realización, la composición comprende desde aproximadamente el 0,13% hasta aproximadamente el 3% de ácido láctico y tiene un pH de desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 5.

- 40 La presente invención también abarca un método de inhibición del crecimiento microbiano en una composición de alimento para mascotas, que comprende añadir un componente en una cantidad eficaz para conferir un efecto antimicrobiano a la composición.

En la presente invención, el componente está presente en la composición en una cantidad de desde aproximadamente el 0,1% hasta aproximadamente el 3% en peso de la composición, el componente es ácido láctico, y la composición es un alimento seco para perros o un alimento seco para gatos.

- 45 En otra realización, la composición comprende desde aproximadamente el 0,13% hasta aproximadamente el 3% de

ácido láctico y tiene un pH de desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 5.

En otra realización, el ácido láctico está presente en la composición en una cantidad de aproximadamente el 0,01%, aproximadamente el 0,1%, aproximadamente el 0,13%, aproximadamente el 0,15%, aproximadamente el 0,2%, aproximadamente el 0,25%, aproximadamente el 0,3%, aproximadamente el 0,4%, aproximadamente el 0,5%, aproximadamente el 1%, aproximadamente el 2% o aproximadamente el 3%.

La descripción proporciona además un método de inhibición del crecimiento microbiano que comprende añadir al alimento un componente en una cantidad de aproximadamente el 0,1%, aproximadamente el 0,13%, aproximadamente el 0,15%, aproximadamente el 0,2%, aproximadamente el 0,25%, aproximadamente el 0,3%, aproximadamente el 0,4%, aproximadamente el 0,5%, aproximadamente el 1%, aproximadamente el 2%, aproximadamente el 3%, desde aproximadamente el 0,1% hasta aproximadamente el 3%, en peso de la composición, por ejemplo aplicando el componente a un producto de croqueta seco.

Las composiciones, además del componente que confiere un efecto antimicrobiano, incluyen al menos un componente adecuado para el consumo por un animal de compañía incluyendo, pero sin limitarse a, grasas, hidratos de carbono, proteínas, fibras, agentes de equilibrio nutricional tales como vitaminas, minerales y oligoelementos, y mezclas de los mismos. Un experto habitual en la técnica puede seleccionar la cantidad y el tipo de componentes alimentarios para un alimento típico basado en los requisitos dietéticos del animal, por ejemplo, la especie, edad, tamaño, peso, salud y función del animal.

La parte de componente alimentario de la composición de alimento puede incluir hasta aproximadamente el 100% de cualquier componente alimentario particular o puede incluir una mezcla de componentes alimentarios en diversas proporciones. En determinadas realizaciones, la composición de alimento incluye una combinación de componentes alimentarios en cantidades de aproximadamente el 0% en peso a aproximadamente el 50% en peso de grasa, de aproximadamente el 0% en peso a aproximadamente el 75% en peso de hidratos de carbono, de aproximadamente el 0% en peso a aproximadamente el 95% en peso de proteína, de aproximadamente el 0% en peso a aproximadamente el 40% en peso de fibra dietética, y de aproximadamente el 0% en peso a aproximadamente el 15% en peso de uno o más agentes de equilibrio nutricional.

En determinadas realizaciones, se obtiene el componente alimentario de grasa e hidratos de carbono a partir de una variedad de fuentes tales como grasa animal, aceite de pescado, aceite vegetal, carne, subproductos cárnicos, granos, otras fuentes animales o vegetales, y mezclas de los mismos. Los granos incluyen trigo, maíz, cebada y arroz.

En determinadas realizaciones, se obtiene el componente alimentario de proteína a partir de una variedad de fuentes tales como plantas, animales, o ambos. La proteína animal incluye carne, subproductos cárnicos, productos lácteos y huevos. Las carnes incluyen la carne de aves de corral, pescado y animales tales como ganado, cerdos, ovejas, cabras, y similares, los subproductos cárnicos incluyen pulmones, riñones, cerebros, hígados, estómagos e intestinos. El componente alimentario de proteína también pueden ser péptidos y/o aminoácidos libres. Preferiblemente, el componente alimentario de proteína incluye carne, un subproducto cárnico, productos lácteos o huevos.

En determinadas realizaciones, se obtiene el componente alimentario de fibra a partir de una variedad de fuentes tales como fuentes de fibra vegetal, por ejemplo, celulosa, pulpa de remolacha, cáscaras de cacahuetes y fibra de soja.

En determinadas realizaciones, se obtienen los agentes de equilibrio nutricional a partir de una variedad de fuentes conocidas por los expertos en la técnica, por ejemplo, componentes alimentarios y complementos vitamínicos y de minerales. Las vitaminas y los minerales pueden incluirse en cantidades requeridas para evitar deficiencias y mantener la salud. Estas cantidades están fácilmente disponibles en la técnica. La Asociación Americana de Funcionarios de Control de Piensos (AAFCO) proporciona cantidades recomendadas de tales nutrientes para perros y gatos. Las vitaminas generalmente útiles como aditivos alimentarios incluyen vitamina A, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, vitamina D, biotina, vitamina K, ácido fólico, inositol, niacina y ácido pantoténico. Los minerales y oligoelementos útiles como aditivos alimentarios incluyen calcio, fósforo, sodio, potasio, magnesio, cobre, zinc, cloruro, hierro, selenio, yodo y hierro.

En determinadas realizaciones, las composiciones de alimento puede contener componentes adicionales tales como vitaminas, minerales, cargas, potenciadores de la palatabilidad, agentes aglutinantes, aromas, estabilizantes, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, tampones, sales, recubrimientos, y similares conocidos por los expertos. Los estabilizantes incluyen sustancias que tienden a aumentar la vida útil en almacenamiento de la composición tales como conservantes, agentes sinérgicos y secuestrantes, gases de envasado, estabilizantes, emulsionantes, espesantes, agentes gelificantes y humectantes. Ejemplos de agentes emulsionantes y/o espesantes incluyen gelatina, éteres de celulosa, almidón, ésteres de almidón, éteres de almidón y almidones modificados. Las

cantidades específicas para cada componente de la composición, componente alimentario, y otros componentes dependerán de una variedad de factores tales como los componentes particulares incluidos en la composición; la especie animal; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del animal; la tasa de consumo del animal; el tipo de enfermedad o estado que esté tratándose; y similares. Por tanto, el componente y las cantidades de componente pueden variar ampliamente y pueden desviarse de las proporciones preferidas descritas en el presente documento.

En una realización ilustrativa, la composición puede incluir también, por ejemplo, además del componente que tiene actividad antimicrobiana, al menos uno de los siguientes:

- (a) de aproximadamente el 0% en peso a aproximadamente el 95% en peso de proteína,
- (b) de aproximadamente el 0% a aproximadamente el 75% de hidratos de carbono,
- (c) de aproximadamente el 0% a aproximadamente el 50% de grasa,
- (d) de aproximadamente el 0% a aproximadamente el 40% de fibra dietética, y
- (e) de aproximadamente el 0% a aproximadamente el 15% de uno o más agentes de equilibrio nutricional.

Las composiciones pueden incluir componentes como los que se encuentran normalmente en alimento para perros y gatos, por ejemplo los alimentos secos caninos pueden comprender mezclas de algunos o todos de los siguientes componentes: maíz integral, desecho de molienda de soja, harina de subproductos de pollo, celulosa en polvo, harina de gluten de maíz, harina de soja, aroma de hígado de pollo, aceite de soja, linaza, color caramelo, sal yodada, L-lisina, cloruro de colina, cloruro de potasio, vitaminas (L-ascorbil-2-polifosfato (fuente de vitamina C), complemento de vitamina E, niacina, mononitrato de tiamina, complemento de vitamina A, pantotenato de calcio, biotina, complemento de vitamina B12, clorhidrato de piridoxina, riboflavina, ácido fólico, complemento de vitamina D3), complemento de vitamina E, minerales (por ejemplo, sulfato ferroso, óxido de zinc, sulfato de cobre, óxido manganeso, yodato de calcio, selenito de sodio), taurina, L-carnitina, glucosamina, tocoferoles mixtos, beta-caroteno, extracto de romero.

En diversas realizaciones, la composición de alimento para mascotas comprende una composición de alimento húmedo o seco, que puede estar en forma de un alimento húmedo, alimento semihúmedo, alimento, complemento o recompensa secos. La composición de alimento para mascotas puede estar en forma de croqueta. La composición de alimento para mascotas puede ser adecuada para un animal canino o felino. El componente que tiene actividad antimicrobiana puede incorporarse en la misma o en la superficie de cualquier composición de alimento, tal como, mediante pulverización o precipitación sobre la misma o puede añadirse a la dieta a modo de aperitivo, complemento, recompensa o en la parte líquida de la dieta tal como agua u otro líquido.

A menos que se especifique de otra manera, debe entenderse que todos los porcentajes y cantidades expresados en el presente documento y en otra parte en la memoria descriptiva se refieren a porcentajes en peso. Las cantidades dadas se basan en el peso activo del material.

**Ejemplos**

Se examinaron los componentes (tabla 1) para evaluar su actividad antimicrobiana frente a *Salmonella* (*S. aarhus*, *S. muenster* *El* y *S. worthington*).

Tabla 1. Componentes con posible actividad antimicrobiana

Tipo	Componente
Ácido inorgánico	Ácido fosfórico
Ácido orgánico	92% de lactato de sodio y 6% de diacetato de sodio
	98% de lactato de sodio
	88% de ácido láctico
	60% de lactato de sodio
	73% de lactato de potasio y 5% de diacetato de sodio
	Arginato láurico
	Ácido propiónico
	Propionato de Ca
Propionato de Ca, 5% de propionato de Na	

Tipo	Componente
	Propionato de Ca, propionato de Zn
Fito-AMI	Oleoresina de orégano
Bacto-AMI	Dextrosa en cultivo
Fenoles	Mayores niveles de grupos fenol. pH 4,25-4,85
	Mayores niveles de grupos fenol. pH 4,8-6,0
	Mayores niveles de grupos fenol. pH 2-2,5
	Mayores niveles de grupos fenol. pH 2-2,5
Misceláneos químicos	Bisulfato de sodio

**Ejemplo 1 - Prueba de difusión en disco**

5 Esta prueba se usa normalmente para evaluar la sensibilidad a antibióticos en bacterias y se adaptó para medir la supresión del crecimiento de *Salmonella* por componentes con posible actividad antimicrobiana (AMI). Se empaparon discos de papel de filtro, de aproximadamente 5 mm de diámetro, en un AMI al 1%, al 2% y al 3%, exceptuando el orégano, que se empapó en disolución al 0,1%, al 0,2% y al 0,4% y se puso en una placa de Petri con agar para métodos estándar con tetrafeniltetrazolio (TTC) que se había extendido con una suspensión normalizada de *Salmonella* (*S. aarhus*, *S. muenster* *El* y *S. worthington*). Se validó la eficacia del AMI midiendo cómo de cerca crecían los cultivos de *Salmonella* con respecto al papel de filtro saturado.

10 Se examinaron los componentes para evaluar su actividad antimicrobiana usando la prueba de difusión en disco. Se prepararon disoluciones del 1%, del 2% y del 3% para cada uno de estos componentes, exceptuando el orégano, que se preparó al 0,1%, al 0,2% y al 0,4%. Se empaparon los discos, se pusieron en una placa de agar para métodos estándar con TTC extendido con *Salmonella* y se incubaron durante la noche tal como se comentó anteriormente. Se determinó la eficacia de estos componentes midiendo las zonas claras (mm) alrededor de los discos (tabla 2).

15 Tabla 2. Resultados de examen de componentes con posible actividad antimicrobiana frente a *Salmonella* mediante la prueba de difusión en disco

Componente	R 1*		R 2		R 3	
	Parcial (mm)	Total (mm)	Parcial (mm)	Total (mm)	Parcial (mm)	Total (mm)
Oleoresina de orégano		5,67	2,67	9,0	2,8	9,08
Dextrosa en cultivo, polvo						
Dextrosa en cultivo, sal de ácido en polvo				7,58		6,17
Dextrosa en cultivo, sal de ácido en polvo						
Aroma líquido n.º 1				3,67		7,83
Aroma líquido n.º 2		15	6,0	22,67	11,17	25,5
Ácido inorgánico (ácido fosfórico)	9,33	16,67	14,33	24,0	21,0	28,33
* 3 réplicas						

Se observó actividad antimicrobiana frente a *Salmonella* como sigue en orden decreciente: ácido fosfórico > fenoles, pH 4,25-4,85> oleoresina de orégano > 92% de lactato de sodio y 6% de diacetato de sodio > fenoles, pH 4,8-6,0.

**Ejemplo 2 - Prueba de difusión en croqueta**

20 La prueba de difusión en croqueta tiene principios similares al método de difusión en disco. Se usaron croquetas enteras (producto terminado) recubiertas con diferentes niveles de AMI (al 1%, al 2% y al 3%, exceptuando el orégano al 0,1%, al 0,2% y al 0,4%) en vez de los discos. Se pusieron las croquetas en una placa de Petri con agar para métodos estándar con TTC que se había extendido con una suspensión normalizada de *Salmonella* (*S. aarhus*, *S. muenster* *El* y *S. worthington*). Se validó la eficacia del AMI midiendo cómo de cerca crecían los cultivos de *Salmonella* con respecto a las croquetas saturadas.

Se revistieron composiciones de alimento para mascotas caninas y felinas adultas comerciales en forma de croquetas con posibles AMI. Se pusieron los granos de croqueta sobre el agar para métodos estándar con TTC ya extendido con *Salmonella* (*S. aarhus*, *S. muenster* *El* y *S. worthington*). Después de la incubación durante la noche a 30°C, se analizaron las placas para evaluar la presencia de zonas claras alrededor de las croquetas.

30 Ácido propiónico, ácido fosfórico, ácido láctico, fenoles y propionato de Ca inhibieron *Salmonella* mostrando una zona clara alrededor de las croquetas (tabla 3).



## ES 2 600 312 T3

Tabla 3. Resultados de la prueba de difusión en croqueta de diferentes componentes con posible actividad antimicrobiana frente a *Salmonella*

Componente	Diámetro de la zona de inhibición (mm)						Media
	REP I		REP II		REP III		
	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	Placa 1	Placa 2	
Ácido fosfórico al 3%	9	7	7	9	9	7	8
Ácido láctico al 3%	10	9	11	8	9	11	10
Ácido propiónico de calidad química al 3%	30	28	31	34	33	30	31
Ácido propiónico de calidad química al 3% (en CWG)	34	34	28	31	28	31	31
Ácido propiónico al 0,65%	8	10	5	10	13	5	9
Ácido propiónico al 1,3%	25	18	25	25	13	20	21
Ácido propiónico al 2%	47	49	47	43	30	25	40
Disolución al 1% líquida de propionato de Ca	5	16	4	9	9	9	9
Disolución al 2% líquida de propionato de Ca	19	14	18	19	16	14	17
Disolución al 3% líquida de propionato de Ca	20	15	19	25	24	25	21

### Ejemplo 3 - CIM (concentración inhibitoria mínima)

- 5 La concentración inhibitoria mínima (CIM) de un componente antimicrobiano se define como la dilución máxima del producto que todavía inhibirá el crecimiento de *Salmonella*. Se prepararon diluciones en serie (al 0-3%, exceptuando el orégano al 0-0,3%) del AMI en medios para crecimiento bacteriano y se vertieron en tubos de ensayo. Entonces se añadieron los organismos de prueba (*S. aarhus*, *S. muenster* El y *S. worthington*) a las diluciones de los componentes AMI a una concentración final de  $10^6$  ó  $10^3$  ufc/g, se incubaron durante la noche a 30°C, y se puntuaron para evaluar el crecimiento mediante turbidez o recuentos de placa.
- 10 Se realizó la concentración inhibitoria mínima para  $10^3$  y  $10^6$  ufc/g de *Salmonella*. Los resultados notificados con signo negativo significan inhibición, mientras que el signo positivo indica crecimiento. El orégano necesitó una CIM del 0,15% para inhibir *Salmonella*, mientras que, se requirió al menos el 0,9% para fenol de pH 4,25-4,85, fenol de pH 2-2,5, fenol de pH 2-2,5, ácido fosfórico, ácido láctico, ácido propiónico, propionato de calcio/propionato de zinc y bisulfato de sodio, y el 0,15% para arginato láurico (tablas 4 y 5).
- 15 Tabla 4. Resultados de CIM de componentes con posible actividad antimicrobiana frente a  $10^6$  ufc/g de *Salmonella*

Componente	Nivel antimicrobiano (% antimicrobiano)									
	0,3	0,27	0,24	0,21	0,15	0,09	0,03	0,015	0,003	0
Orégano	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Componente	Nivel de agente antimicrobiano (% de agente antimicrobiano)									
	3	2,7	2,4	2,1	1,5	0,9	0,3	0,15	0,03	0
Fenoles, pH 4,25-4,85	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Fenoles, pH 4,8-6,0	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Fenoles, pH 2-2,5	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Ácido fosfórico	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Ácido láctico	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Ácido propiónico	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Propionato de Ca, propionato de Zn	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Arginato láurico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Bisulfato de sodio	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

Tabla 5. Resultados de CIM de componentes con posible actividad antimicrobiana frente a  $10^3$  ufc/g de *Salmonella*

Componente	Nivel de agente antimicrobiano (%de agente antimicrobiano)									
	0,3	0,27	0,24	0,21	0,15	0,09	0,03	0,015	0,003	0
Orégano	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Componente	Nivel de agente antimicrobiano (%de agente antimicrobiano)									
	3	2,7	2,4	2,1	1,5	0,9	0,3	0,15	0,03	0
Fenoles, pH 4,25-4,85	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Fenoles, pH 4,8-6,0	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Fenoles, pH 2-2,5	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

(continuación)

Ácido fosfórico	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Ácido láctico	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Ácido propiónico	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Propionato de Ca, propionato de Zn	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Arginato láurico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Bisulfato de sodio	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

**Ejemplo 4 - Estudios de exposición y pruebas de palatabilidad**

- 5 Se sometieron a prueba productos terminados recubiertos con AMI (al 0-3%) en un estudio de exposición. Se inoculó cada croqueta de 100 g de croquetas con *Salmonella* (*S. aarhus*, *S. muenster* El y *S. worthington*) hasta una concentración final de  $10^6$ , y se incubaron a 30°C. Se realizaron recuentos de *Salmonella* a intervalos de tiempo predeterminados. Se realizaron estudios de palatabilidad (2 cuencos, 2 días) para composiciones de alimento para mascotas caninas y felinas adultas con AMI frente a un control sin AMI.
- 10 Se seleccionaron ácido láctico, fenoles de pH 4,25-4,85, fenoles de pH 2-2,5, ácido propiónico, arginato láurico, ácido fosfórico y orégano para estudios de palatabilidad y exposición microbiana. Se prepararon composiciones de alimento para mascotas caninas y felinas adultas con diferentes niveles de estos agentes antimicrobianos para llevar a cabo las pruebas de palatabilidad (tablas 6-9).
- 15 Se sometieron a estudios de exposición microbiana composiciones de alimento para mascotas caninas adultas con diferentes niveles de AMI. Se inocularon porciones de 100 gramos de croquetas hasta una concentración final de  $10^6$  ufc/g de *Salmonella*, y se incubaron a 30°C. Se realizaron recuentos de *Salmonella* a intervalos de tiempo predeterminados. Ácido láctico al 1% en el preacondicionador y al 2-3% añadido de manera tópica (mezclado con DT10L®) redujo *Salmonella* en dos ciclos logarítmicos más que el control (figura 1 y figura 2).
- 20 La palatabilidad para composiciones de alimento para mascotas caninas adultas con agentes antimicrobianos añadidos de manera tópica o al preacondicionador estaba al menos en igualdad frente a un control (tablas 6 y 7). Las composiciones de alimento para mascotas felinas adultas con agentes antimicrobianos añadidos al preacondicionador estaban al menos en igualdad frente a un control (tablas 8 y 9).

Tabla 6. Resultados de palatabilidad de composiciones de alimento para mascotas caninas con agentes antimicrobianos añadidos de manera tópica frente a un control sin agentes antimicrobianos

Componente	Razón de ingesta	% de preferencia de prueba/control
Ácido láctico (%)		
0,13	0,5282	27/64
0,25	0,5043	42/46
0,50	0,5985	76/24
1,00	0,4343	39/61
2,00	0,3202	17/79
2,00	0,5903	56/36
3,00	0,5286	67/29
3,00	0,5544	58/29
Fenol, pH 4,25-4,85 (%)		
0,25	0,5760	60/36
Fenol, pH 2-2,5 (%)		
0,25	0,6178	68/24
0,50	0,5860	60/32
1,00	0,4527	21/67
2,00	0,4908	33/67
3,00	0,4178	32/52
Ácido propiónico (%)		
0,25	0,4199	21/71
0,50	0,8064	92/4
1,00	0,5410	54/46
2,00	0,5875	64/32
3,00	0,5060	44/52
Arginato láurico (%)		
0,1	0,6460	72/16
0,2	0,5100	38/50
0,4	0,5993	56/32

ES 2 600 312 T3

Componente	Razón de ingesta	% de preferencia de prueba/control
0,8	0,4628	36/56
Ácido fosfórico (%)		
0,25	0,5149	28/48
Orégano (%)		
0,038	0,4452	22/65
0,075	0,5461	67/29
0,150	0,3117	13/80
0,300	Cancelado	

Tabla 7. Resultados de palatabilidad de composiciones de alimento para mascotas caninas con agentes antimicrobianos añadidos de manera tópica frente a un control sin agentes antimicrobianos

Componente	Razón de ingesta	% de preferencia de prueba/control
Fenol, pH 2-2,5 (%)		
0,25	0,4497	38/56
0,50	0,4297	24/68
1,00	0,4576	44/52
2,00	0,4192	28/60
3,00	0,5601	64/28
Ácido propiónico (%)		
0,50	0,6100	84/4
1,00	0,5165	48/40
2,00	0,5029	48/40
3,00	0,4209	40/56
Arginato láurico		
0,1	0,5475	58/29
0,2	0,3390	13/82
0,4	0,4883	46/46
0,8	0,3228	13/80
Ácido fosfórico (%)		
0,25	0,4983	48/44
Orégano (%)		
0,038	0,4998	44/48
0,075	0,4933	38/50
0,150	0,4267	52/44
0,300	0,4680	50/46

Tabla 8. Resultados de palatabilidad de composiciones de alimento para mascotas felinas con agentes antimicrobianos añadidos de manera tópica frente a un control sin agentes antimicrobianos

Componente	Razón de ingesta	% de preferencia de prueba/control
Ácido láctico (%)		
0,25	0,5451	52/40
0,50	0,2834	13/83
0,75	0,2411	8/88
1,00	0,3445	20/80
2,00	0,3032	16/80
3,00	0,1192	9/91
Fenol, pH 4,25-4,85 (%)		
0,25	0,4747	36/60
Fenol, pH 2-2,5 (%)		
0,25	0,4112	36/60
0,50	0,3265	25/67
0,75	0,2652	25/75
1,00	0,1279	8/92
2,00	0,1586	13/88
3,00	0,2412	12/88
Ácido propiónico (%)		
0,25	0,3964	32/68
0,50	0,4393	33/58
0,75	0,3889	24/72
1,00	0,4516	36/55
2,00	0,2591	13/87

Componente	Razón de ingesta	% de preferencia de prueba/control
3,00	0,1601	4/96
Arginato láurico (%)		
0,1	0,4583	39/52
0,2	0,5203	46/46
0,4	0,3132	20/72
0,8	0,1002	0/100
Orégano (%)		
0,038	0,2697	17/79
0,075	0,3574	32/68
0,150	0,3028	24/76
0,300	0,0861	5/95

Tabla 9. Resultados de palatabilidad de composiciones de alimento para mascotas felinas con agentes antimicrobianos añadidos de manera tópica frente a un control sin agentes antimicrobianos

Componente	Razón de ingesta	% de preferencia de prueba/control
Ácido láctico (%)		
0,25	0,4891	46/50
0,50	0,4986	48/36
0,75	0,3981	32/64
1,00	0,5567	46/38
2,00	0,4804	42/54
3,00	0,5111	54/38
Fenol, pH 4,25-4,85 (%)		
0,25	0,4735	40/56
0,50	0,5807	60/32
0,75	0,4999	42/58
1,00	0,5342	63/33
2,00	0,3947	35/61
3,00	0,4982	50/45
Fenol, pH 2-2,5 (%)		
0,25	0,4517	36/56
0,50	0,3271	26/65
0,75	0,3435	27/64
1,00	0,3787	29/67
2,00	0,2955	26/74
3,00	0,4248	42/58
Orégano (%)		
0,038	0,5223	46/42
0,075	0,4373	48/40
0,150	0,4691	40/56
0,300	0,5301	50/46
Arginato láurico (%)		
0,10	0,5124	44/44
0,20	0,6648	83/17
0,40	0,5180	52/44
0,80	0,5492	63/33

**Ejemplo 5 - Producción de croqueta recubierta con ácido propiónico**

Preparación e incubación de muestras

- 5 Se produjeron composiciones de alimento para mascotas caninas adultas con ácido propiónico. Se tomaron muestras para simular diferentes etapas del procedimiento. 1) Se dejó caer una croqueta sobre una cinta transportadora, discurrir a través del enfriador, y entonces se envasó. Esto era para simular como sale el producto de la extrusora y pasa a través del elevador neumático hasta la secadora. El objetivo de humedad era de aproximadamente el 20%. 2) Se redujo la temperatura de la secadora y se aumentó la velocidad de cinta. Esto era para simular el producto en la planta que se secó parcialmente, saliendo posiblemente de la primera cinta y dejándolo caer a la segunda cinta. El objetivo de humedad era de aproximadamente el 15%. 3) Se recogió la croqueta seca después de la secadora tanto para el producto terminado como de base sin recubrir. El objetivo de humedad era de aproximadamente el 8%.
- 10

Se enfrió la croqueta con humedad intermedia (del 15% y del 20%) para impedir la condensación en la bolsa y no

fomentar el crecimiento de mohos.

5 Se inocularon muestras de la extrusora, secadora, producto terminado y de base sin recubrir (10 kg cada una) con  $10^6$  ufc/g de *Salmonella*. Se atomizó una disolución concentrada de *Salmonella* en disolución tampón a través de un rociador de pintura y se aplicó uniformemente según daba vueltas el producto en una mezcladora rotatoria para suministrar las ufc/g objetivo.

Se revistieron muestras de base sin recubrir con agentes tópicos (agentes de palatabilidad y grasa) después de la inoculación (tabla 10).

Tabla 10. Composiciones de alimento para mascotas caninas adultas para base sin recubrir inoculadas con *Salmonella*

Componente	%	libras
Base sin recubrir	92,51	20,35
Agentes tópicos	7,49	1,65
Total	100	22

10 Se dividieron las muestras y se incubaron en un incubador a 30, 50 ó 70°C. Se eligieron estas temperaturas para representar el producto terminado que todavía no se había enfriado hasta la temperatura ambiental (30°C), el producto pasando a través de la secadora y que empezaba a absorber calor de la secadora (70°C), y el producto que se transfirió a través del elevador neumático y había eliminado una parte de su humedad sometiéndolo a enfriamiento por evaporación rápida (50°C).

15 Se sembraron en placa muestras a 70°C después de 0, 15, 30 y 60 minutos.

Se sembraron en placa muestras a 50°C después de 0, 30, 60 y 240 minutos.

Se sembraron en placa muestras a 30°C después de 0, 1, 2, 3, 8 y 15 días.

20 Se seleccionaron los tiempos de siembra en placa y la duración para probar y representar condiciones a las que el producto estaría expuesto normalmente en la secadora. Las duraciones para cualquiera de las condiciones intermedias no superarían los 20 minutos durante una producción normal, pero el tiempo prolongado en el incubador permitió una separación de las variables del procedimiento, le dio tiempo a los técnicos de laboratorio para extraer muestras y trabajar con ellas, y proporcionó algunos intervalos de tiempo discretos para medir el efecto de los tratamientos.

25 El producto recubierto e inoculado con *Salmonella* (que representa el producto terminado contaminado después de la envolvedora) mostró algún efecto inmediato a partir de la inclusión de ácido propiónico al 3% en el preacondicionador (figura 3). También se mostró un efecto positivo con ácido propiónico al 2% y al 3% añadido de manera tópica/al preacondicionador (figura 4). También mostró un efecto positivo la aplicación tópica de ácido propiónico al 1%, al 2% y al 3% (figura 5). El producto recubierto e inoculado (representa croquetas contaminadas antes de la envoltura) mostró resultados similares con ácido propiónico al 3% (figuras 6-8).

30 También era eficaz frente a *Salmonella* el ácido propiónico en concentraciones del 1%, el 2% y el 3% en todos los puntos del procesamiento. Se observó la reducción en dos logaritmos más que el control para el producto que simula la entrada al elevador neumático (figura 7), durante el enfriamiento por evaporación (figura 8), en la secadora después del enfriamiento en superficie (figura 9) y enfriamiento por evaporación (figura 10).

35 Las pruebas de ampliación a escala con ácido propiónico mostraron que la adición de ácido propiónico al 3% al preacondicionador, al 2 y al 3% tópica/al preacondicionador y al 1, al 2 y al 3% aplicado de manera tópica redujo *Salmonella* en dos ciclos logarítmicos más que un control sin tratar.

#### Ejemplo 6 - Producción de croqueta recubierta con ácido láctico

40 La contaminación de producto terminado de alimento seco para perros con *Salmonella* puede dividirse en 4 ubicaciones: 1) elevador neumático o entrada a la secadora, 2) en la secadora, 3) croqueta sin recubrir (a través de Ro-Tap® y hasta la envolvedora) y 4) croqueta recubierta (desde la envolvedora a través del sistema de envasado). Se procesa la croqueta en una extrusora a alta temperatura y presión. Estas condiciones (122°C y 15 psi) son similares a las que se encuentran en el interior de una retorta y que se cree que producen una croqueta con esterilidad comercial. La croqueta húmeda abandona la extrusora y se retorna a 100°C. La rápida disminución de presión provoca que la croqueta se infle y forme su conformación redondeada y densidad objetivo. La superficie de la croqueta se enfría rápidamente mediante el alto volumen de aire que la transporta en el elevador neumático desde

## ES 2 600 312 T3

la extrusora hasta la secadora. El enfriamiento por evaporación disminuye la temperatura en superficie hasta aproximadamente 50°C y entonces la croqueta empieza a absorber el calor de la secadora. Tras abandonar la secadora, la croqueta se ha recalentado hasta aproximadamente 70°C y se tamiza en Ro-Tap®, punto en el que puede exponerse a aire húmedo frío dependiendo de las condiciones ambientales en la planta. Entonces se envuelve la croqueta (se recubre con componentes secos y líquidos tópicos). Tras la envolvedora, existe una pérdida mínima de humedad según se enfría la croqueta hasta condiciones ambientales y entonces se mantiene para el envasado.

Se modelan pruebas de estas cuatro ubicaciones usando un diseño de bloque equilibrado completo de 3 contenidos de humedad (el 8%, el 15% y el 22%), 3 temperaturas (30°C, 50°C y 70°C), 4 niveles de ácido láctico (ácido láctico al 0,5%, al 1%, al 2% y al 3% más un control negativo), y 3 ubicaciones para la inclusión del ácido láctico (todo el ácido láctico añadido al preacondicionador, todo el ácido láctico añadido en la envolvedora, y una combinación 50/50 de la mitad de ácido láctico añadido al preacondicionador y la mitad añadido en la envolvedora) (tabla 12).

Se somete a prueba el efecto del ácido láctico frente a un cóctel de especies de *Salmonella* (*S. aarhus*, *S. muenster* *El* y *S. worthington*) en diferentes etapas en el procedimiento.

15 Preparación e incubación de muestras:

	70°C	50°C	30°C
22% de humedad/sin recubrir	Representa el producto en el elevador neumático. La temperatura todavía es hostil y debería ser letal para las bacterias.	Representa el producto entrando en la secadora. La temperatura en superficie es lo suficientemente baja como para incubar las bacterias.	El producto húmedo nunca puede enfriarse tanto, pero proporciona una temperatura no destructiva con una croqueta con alta humedad.
15% de humedad/sin recubrir	Representa la croqueta en la mitad de la secadora después de la meseta de humedad y la temperatura en superficie empieza a aumentar.	Representa la croqueta en la mitad de la secadora durante el enfriamiento por evaporación.	El producto intermedio no puede enfriarse tanto, pero proporciona una temperatura no destructiva para un producto intermedio.
8% de humedad/sin recubrir	Representa la croqueta saliendo de la secadora.	Puede representar cierta cantidad de croqueta saliendo de la secadora.	Probablemente no es una temperatura representativa antes de la envoltura, pero equilibra el diseño.
8% de humedad/recubierto	Representa la croqueta en la envolvedora.	Representa la croqueta pasando a través del enfriador.	Representa el producto terminado.

Se producen composiciones de alimento para mascotas caninas con ácido láctico. Se producen muestras para simular diferentes etapas del procedimiento. 1) Se deja caer una croqueta sobre una cinta transportadora, discurre a través del enfriador, y entonces se envasó. Esto es para simular como sale el producto de la extrusora y discurre a través del elevador neumático hasta la secadora. El objetivo de humedad es de aproximadamente el 20%. 2) Se reduce la temperatura de la secadora y se aumenta la velocidad de cinta. Esto es para simular el producto en la secadora en la planta que se seca parcialmente, saliendo posiblemente de la primera cinta y dejándolo caer a la segunda cinta. El objetivo de humedad es de aproximadamente el 15%. 3) Se recoge la croqueta seca después de la secadora tanto para el producto terminado como de base sin recubrir. El objetivo de humedad es de aproximadamente el 8%. Esto es para representar una producción típica.

25 Se enfría la croqueta con humedad intermedia (del 15% y del 20%) hasta la temperatura ambiental para impedir la condensación en la bolsa y no fomentar el crecimiento de mohos.

Se inoculan muestras de la extrusora, secadora, producto terminado y de base sin recubrir (22 libras cada una) con 10<sup>6</sup> ufc/g de especies de *Salmonella*. Se atomiza una disolución concentrada de cóctel de *Salmonella* en disolución tampón a través de un rociador de pintura y se aplica uniformemente según da vueltas el producto en una mezcladora rotatoria para suministrar las ufc/g objetivo.

Se recubren las muestras de base sin recubrir con agentes tópicos después de la inoculación (tabla 12).

Tabla 12. Composiciones de alimento para mascotas caninas para base sin recubrir inoculada con *Salmonella*

Componente	%	libras
Base sin recubrir	92,51	20,35
Agentes tópicos	7,49	1,65
Total	100	22

- 5 Se incuban las muestras en un incubador a 30, 50 ó 70°C. Se eligen estas temperaturas para representar el producto terminado que todavía no se había enfriado hasta la temperatura ambiental (30°C), el producto pasando a través de la secadora y que empieza de nuevo a absorber calor de la secadora (70°C), y el producto que se transfiere a través del elevador neumático y ha eliminado una parte de su humedad sometándolo a enfriamiento por evaporación rápida (50°C).
- Se siembran en placa muestras a 70°C a los 0, 15, 30 y 60 minutos
- Se siembran en placa muestras a 50°C a los 0, 30, 60 y 240 minutos
- Se siembran en placa muestras a 30°C a los 0, 1, 2, 3, 8 y 15 días
- 10 Se seleccionan los tiempos de siembra en placa y la duración para representar las condiciones a las que el producto estaría expuesto normalmente en la secadora. Las duraciones para cualquiera de las condiciones intermedias no superarían los 20 minutos durante una producción normal, pero el tiempo prolongado en el incubador permite una separación de las variables del procedimiento, le da tiempo a los técnicos de laboratorio para extraer muestras y trabajar con ellas, y proporciona algunos intervalos de tiempo discretos para medir el efecto de los tratamientos.
- 15 Este estudio de ampliación a escala somete a prueba los efectos del ácido láctico frente a un cóctel de especies de *Salmonella* (*S. aarhus*, *S. muenster* El y *S. worthington*). Se analizan los productos para evaluar su humedad. Se realiza el análisis por duplicado y los resultados demuestran que se cumplen los objetivos de humedad en la planta piloto.
- 20 Las pruebas con ácido láctico muestran que la adición de ácido láctico al 1%, al 2% y al 3% al preacondicionador, tópica/al preacondicionador, y aplicado de manera tópica reduce *Salmonella* en dos ciclos logarítmicos más que un control sin tratar.
- Se muestra que la aplicación de ácido láctico o bien en la fase de preacondicionamiento o bien en la fase de envoltura es eficaz. La concentración de ácido láctico es crítica. Se muestra un efecto inhibitor creciente según aumenta la concentración.
- 25 El producto recubierto e inoculado con *Salmonella* (que representa el producto terminado contaminado después de la envolvedora) mostró cierto efecto inmediato a partir de las mayores concentraciones de tratamiento con ácido láctico (figuras 11-13). El producto inoculado y después recubierto (representa croquetas contaminadas antes de la envoltura) mostró resultados similares a las mayores concentraciones de ácido láctico (figuras 14-16).
- 30 También es eficaz el ácido láctico (al 1%, al 2% y al 3%) frente a *Salmonella* en todos los puntos de los puntos de procesamiento. Se observa una reducción de dos logaritmos más que el control para el producto que entra en el elevador neumático (figura 17), durante el enfriamiento por evaporación (figura 18), en la secadora después de que la temperatura en superficie empieza a aumentar (figura 19), enfriamiento por evaporación (figura 20) y producto terminado (figuras 11-16).
- 35 Por tanto el ácido láctico es eficaz frente a *Salmonella* en las formulaciones. Tiene un efecto inmediato sobre la viabilidad del cóctel de *Salmonella*. Se demuestra que un umbral de concentración mínima de aproximadamente el 1% es eficaz.

#### Ejemplo 7 - Palatabilidad de las formulaciones

- 40 Se somete a prueba la palatabilidad de las formulaciones de croqueta caninas con niveles variables de ácido láctico añadido como recubrimiento tópico y formulaciones con el ácido láctico añadido en la etapa de preacondicionamiento, en perros frente a un control, con una razón de ingesta de entre 0,5-0,77, en el que una razón de ingesta de 0,5 indica que los perros tenían un ingesta igual de alimento de prueba y control. Los resultados se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Resultados de palatabilidad

Ácido láctico (%)	% de preferencia de prueba/control
<b>TÓPICO</b>	
0,13	27/64
0,25	42/46
0,50	76/24
1,00	39/61
2,00	56/36
3,00	67/29
<b>PREACONDICIONADOR</b>	
0,25	88/8
0,50	80/16
0,75	64/28
1,00	56/36

Se realizaron pruebas adicionales con diferentes formulaciones de croqueta caninas y felinas comerciales, confirmando que la croqueta recubierta con ácido láctico es agradable al paladar y aceptada por perros y gatos. Para evitar el riesgo de irritación estomacal en animales susceptibles, se determina que se mantenga el pH a 4,5 o superior.

5



**REIVINDICACIONES**

1. Uso de ácido láctico para conferir actividad antimicrobiana frente a *Salmonella* en una composición de alimento seco para gatos o en una composición de alimento seco para perros, en el que el ácido láctico está presente en la composición en una cantidad de desde el 0,1% hasta el 3%.
- 5 2. Uso según la reivindicación 1, en el que la composición tiene un pH de menos de 5,5.
3. Uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la composición comprende del 0,13% en peso al 3% en peso de ácido láctico y en el que el pH de la composición es de 4 a 5.
4. Método para producir una composición de alimento para mascotas que tiene actividad antimicrobiana frente a *Salmonella*, que comprende las siguientes etapas:
  - 10 a. precondicionar mezclando componentes húmedos y secos a temperatura elevada para formar una masa de croqueta;
  - b. extruir la masa de croqueta a alta temperatura y presión;
  - c. secar la croqueta extruida; y
  - d. recubrir la croqueta seca con componentes secos y/o líquidos tópicos;
- 15 en el que se aplica a la croqueta un componente que confiere un efecto antimicrobiano sobre la composición en la etapa a y/o d en una cantidad del 0,1% al 3% en peso de la composición,  
en el que el componente antimicrobiano tiene actividad frente a *Salmonella*, la composición es un alimento seco para gatos o alimento seco para perros, y en el que el componente es ácido láctico.
- 20 5. Método según la reivindicación 4, en el que la composición comprende del 0,13% en peso al 3% en peso de ácido láctico y tiene un pH de desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 5.
6. Método de inhibición del crecimiento de *Salmonella* en una composición de alimento para mascotas, que comprende añadir un componente en una cantidad eficaz para conferir un efecto antimicrobiano a la composición, en el que el componente está en la composición en del 0,1% en peso al 3% en peso, en el que la composición es un alimento seco para gatos o un alimento seco para perros, y en el que el componente es ácido láctico.
- 25 7. Método según la reivindicación 6, en el que la composición comprende del 0,13% en peso al 3% en peso de ácido láctico y tiene un pH de 4 a 5.

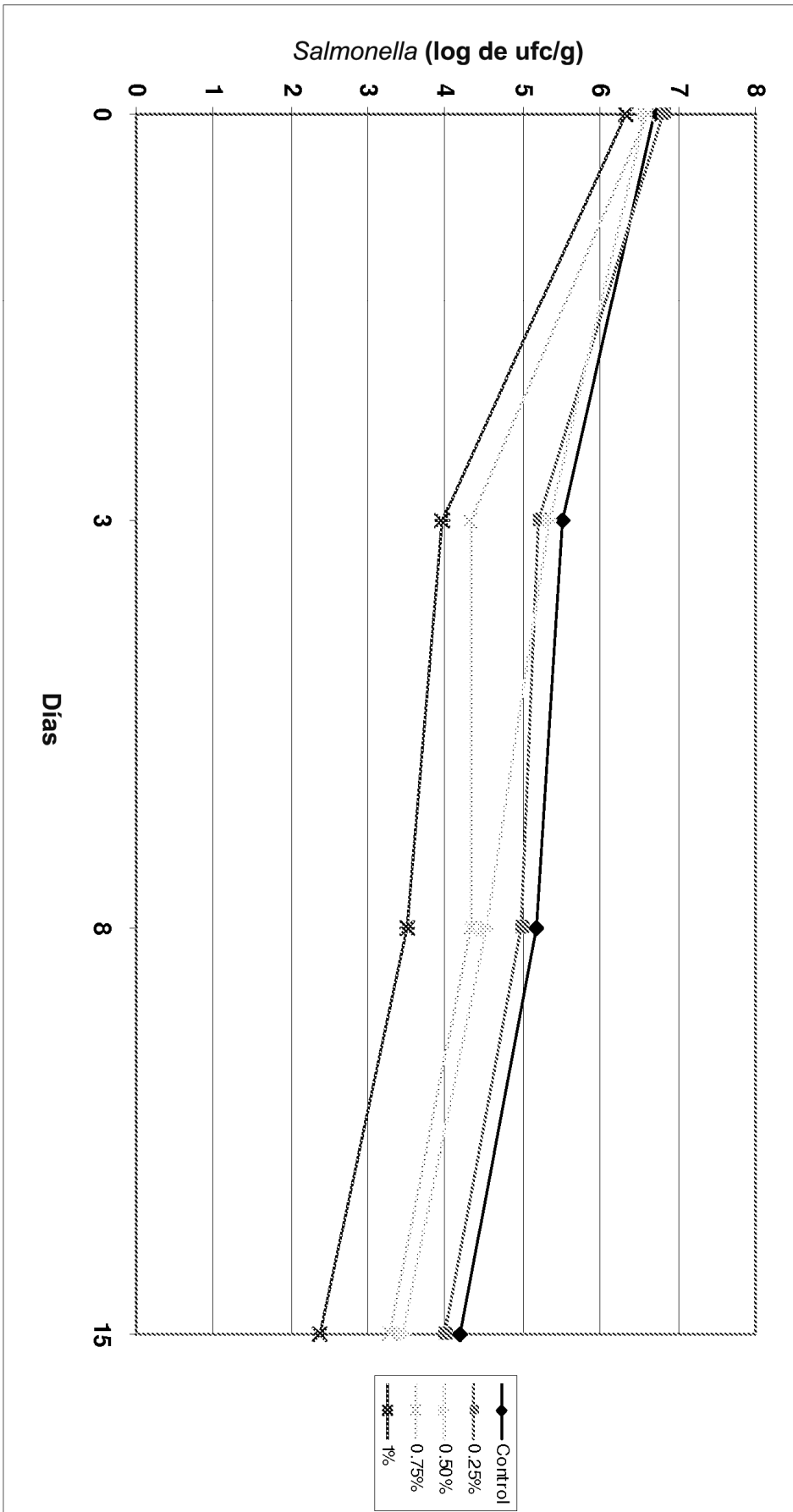


FIGURA 1

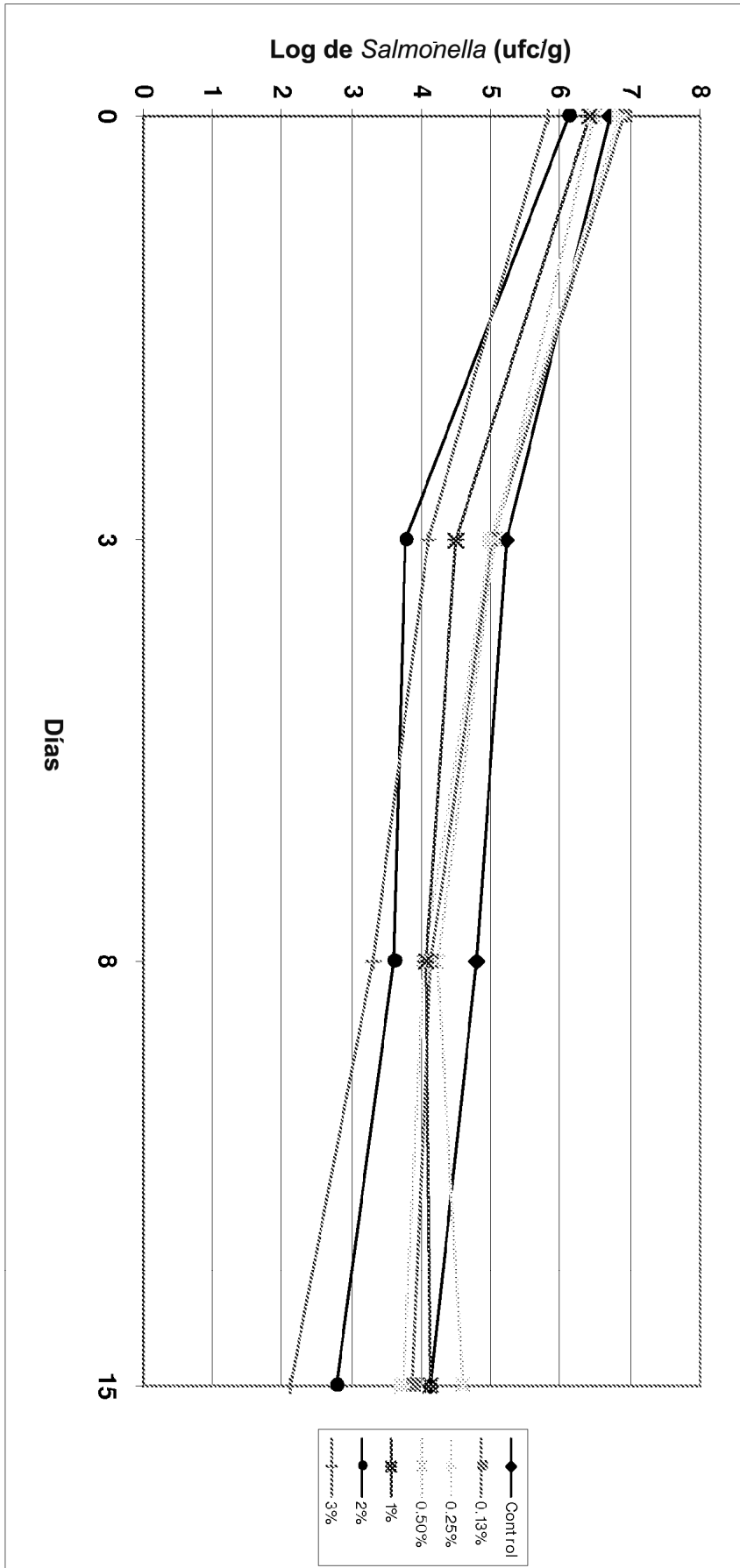


FIGURA 2

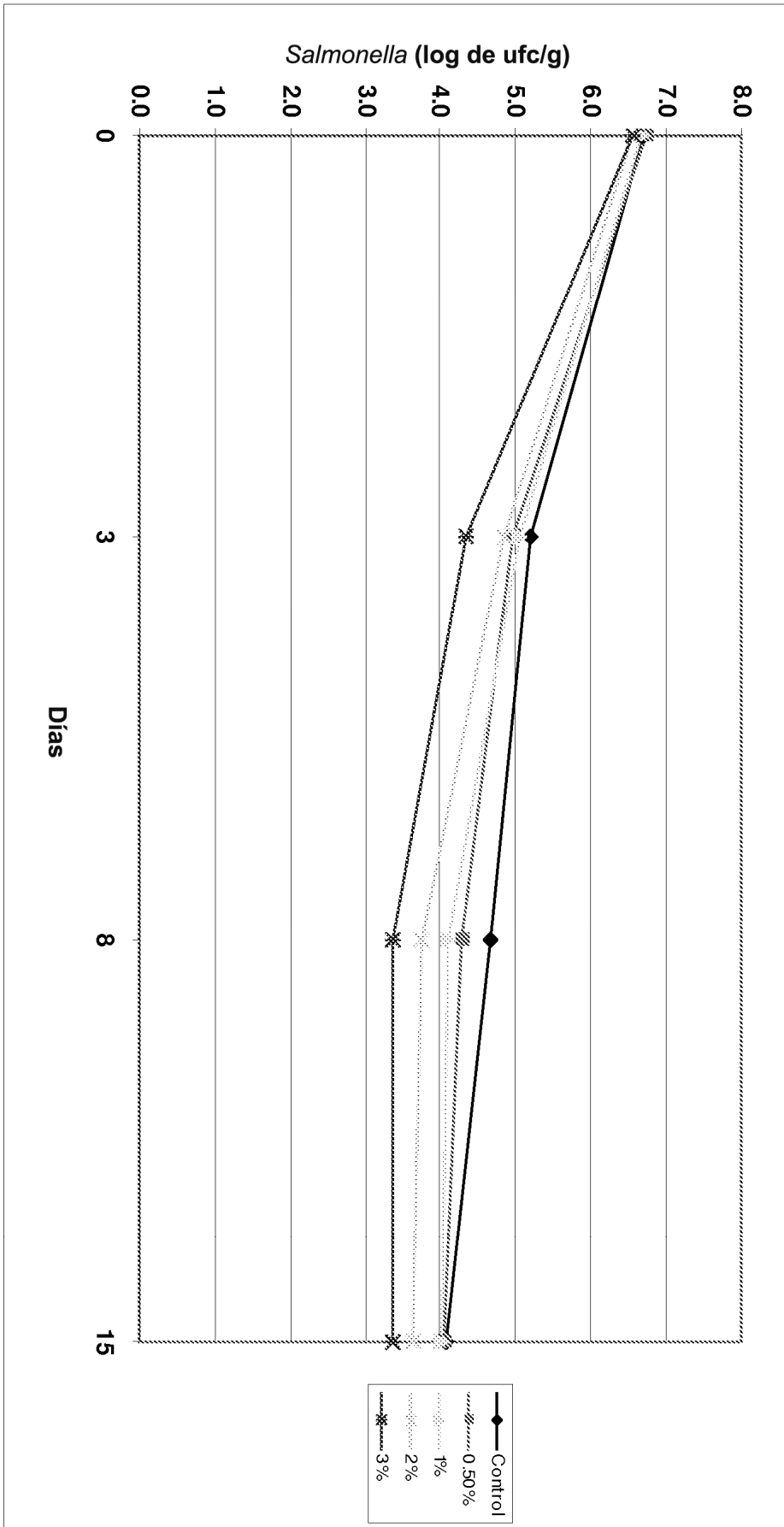


FIGURA 3

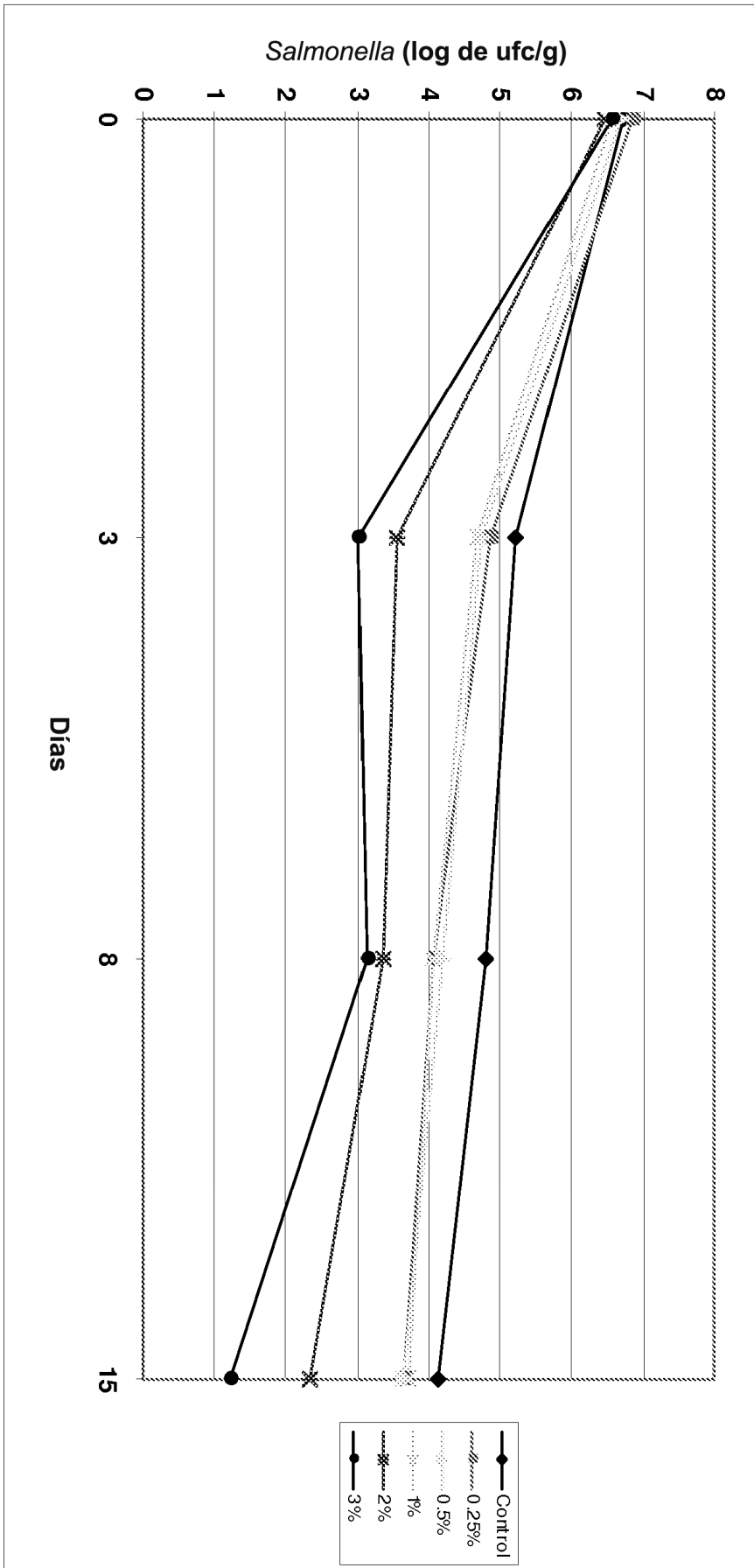


FIGURA 4

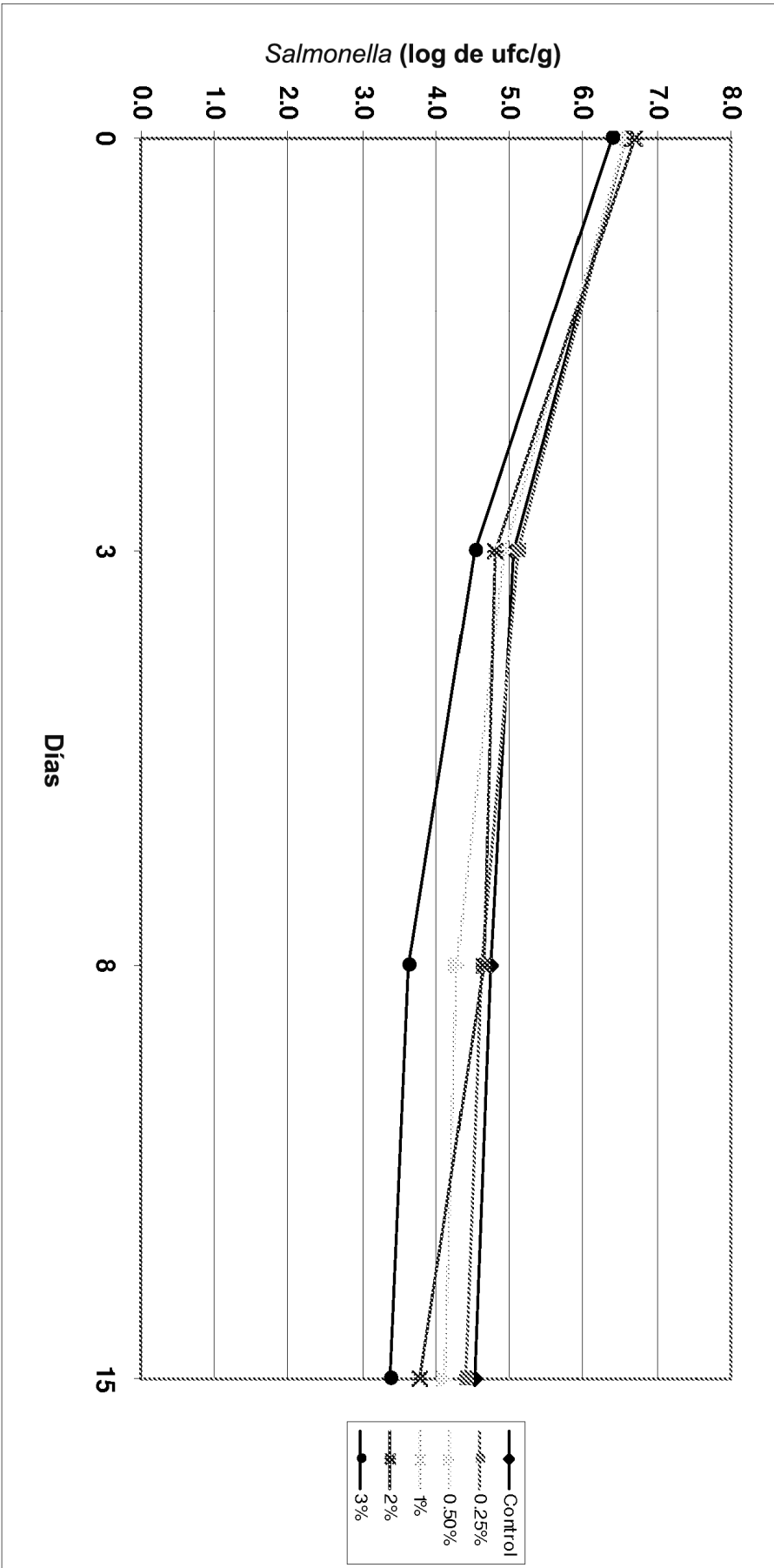


FIGURA 5

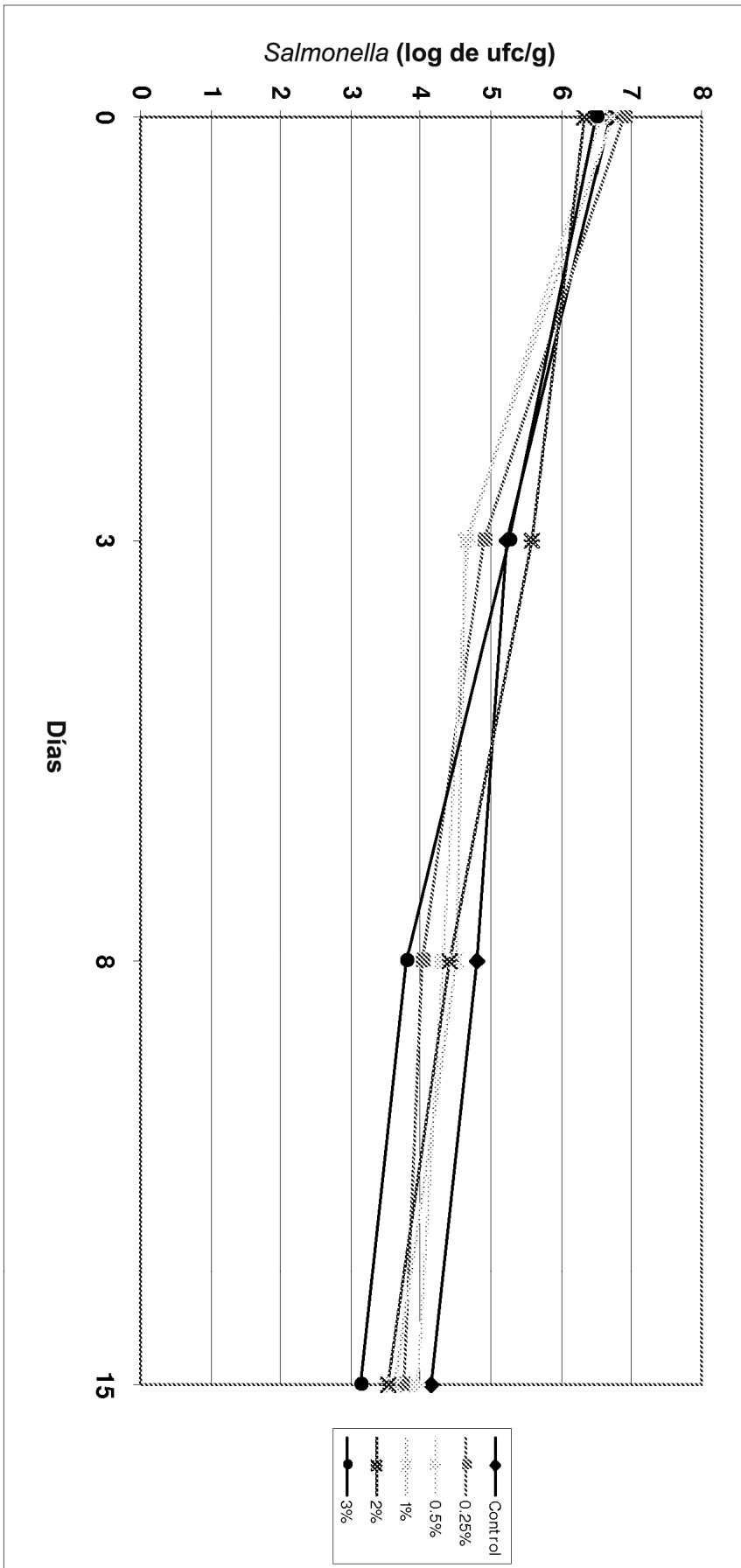


FIGURA 6

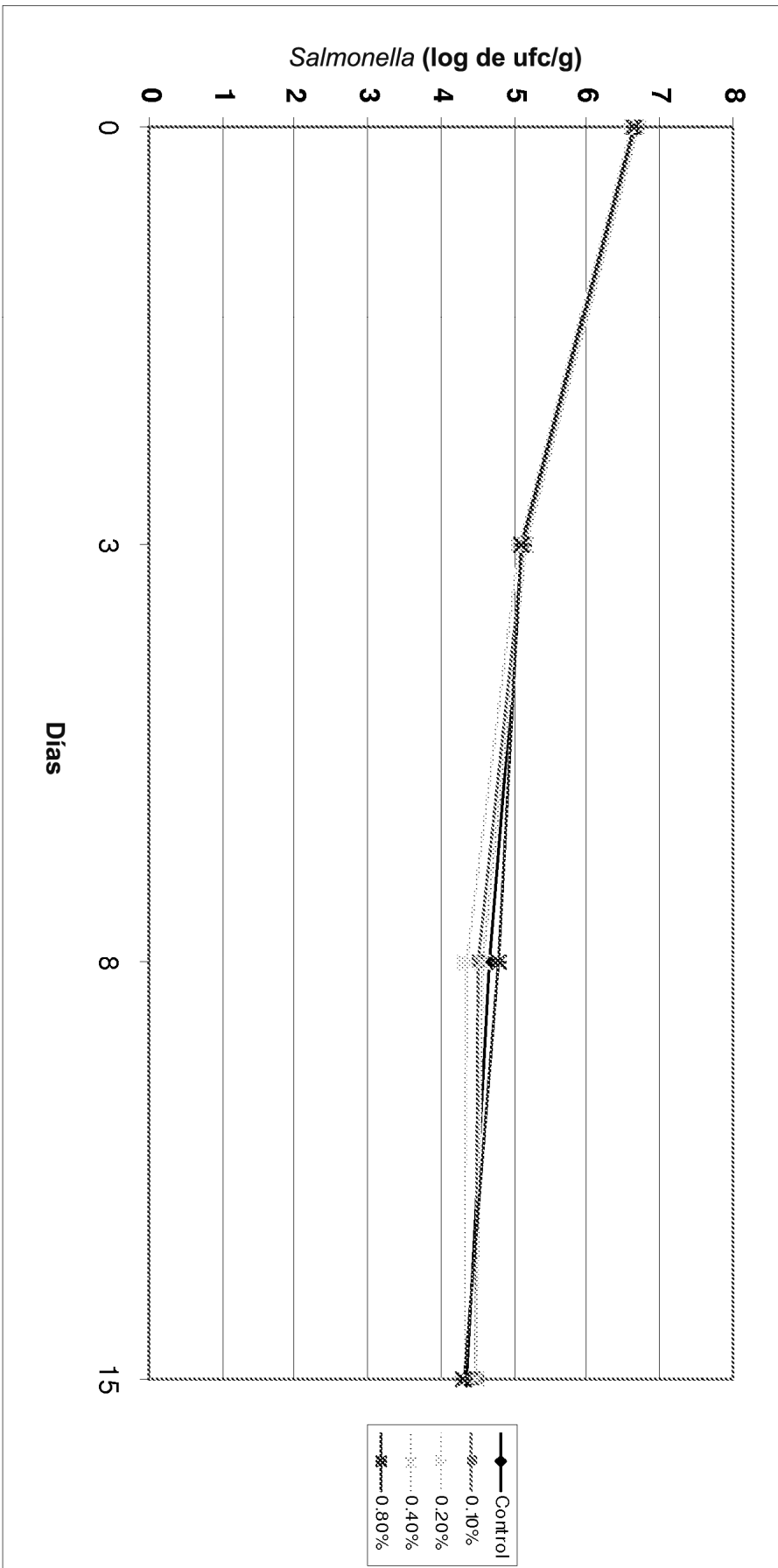


FIGURA 7



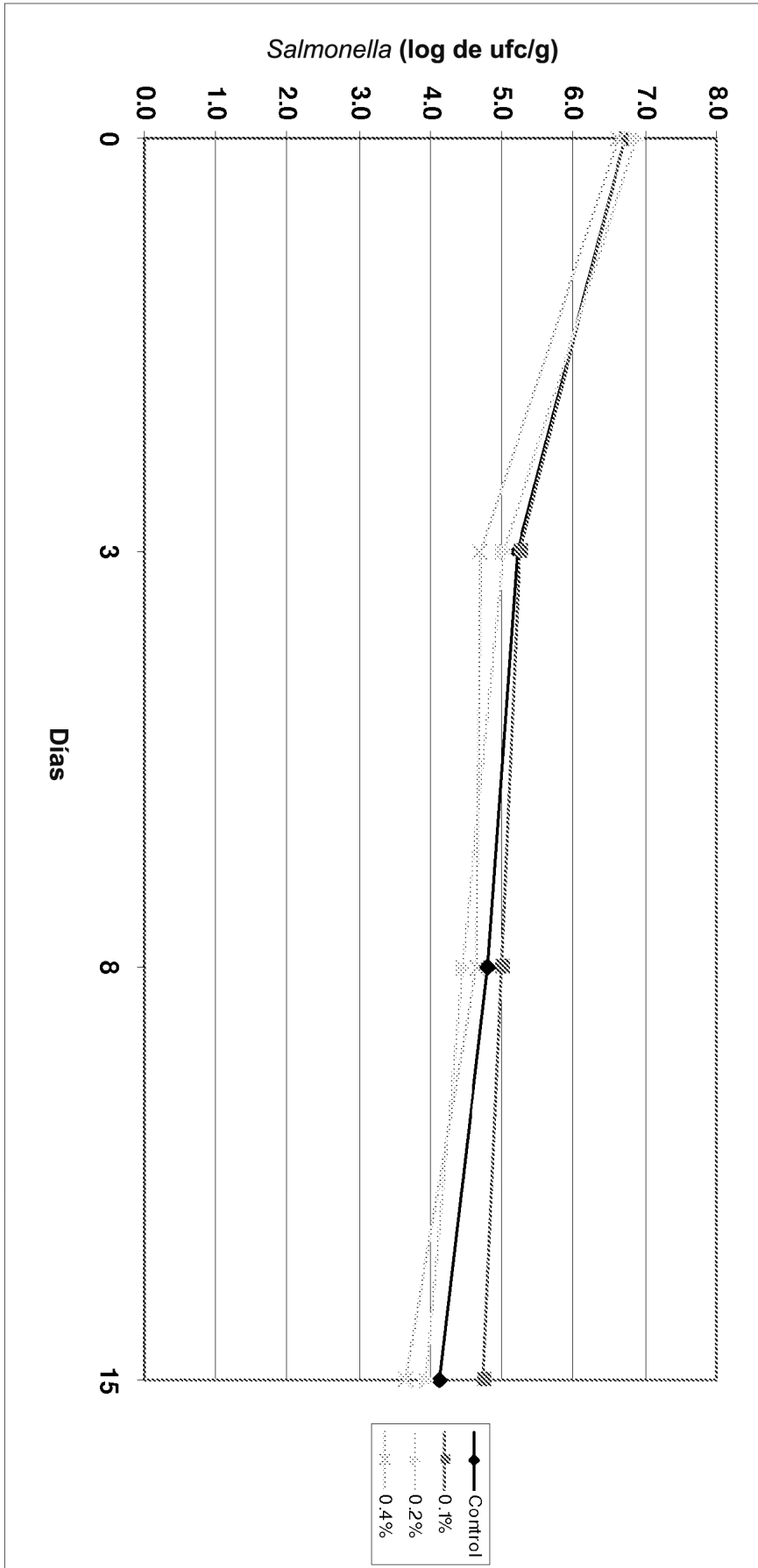


FIGURA 8

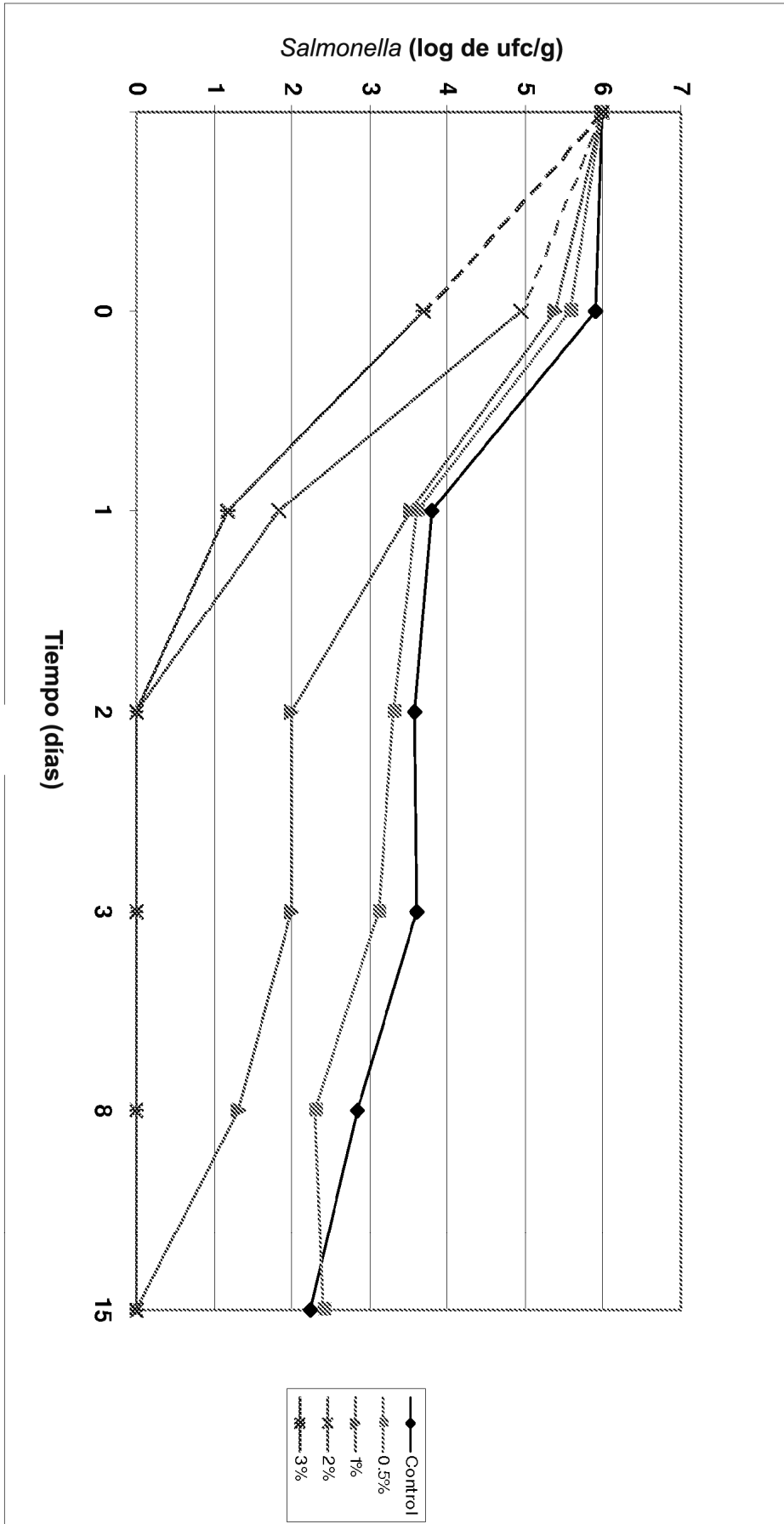


FIGURA 9

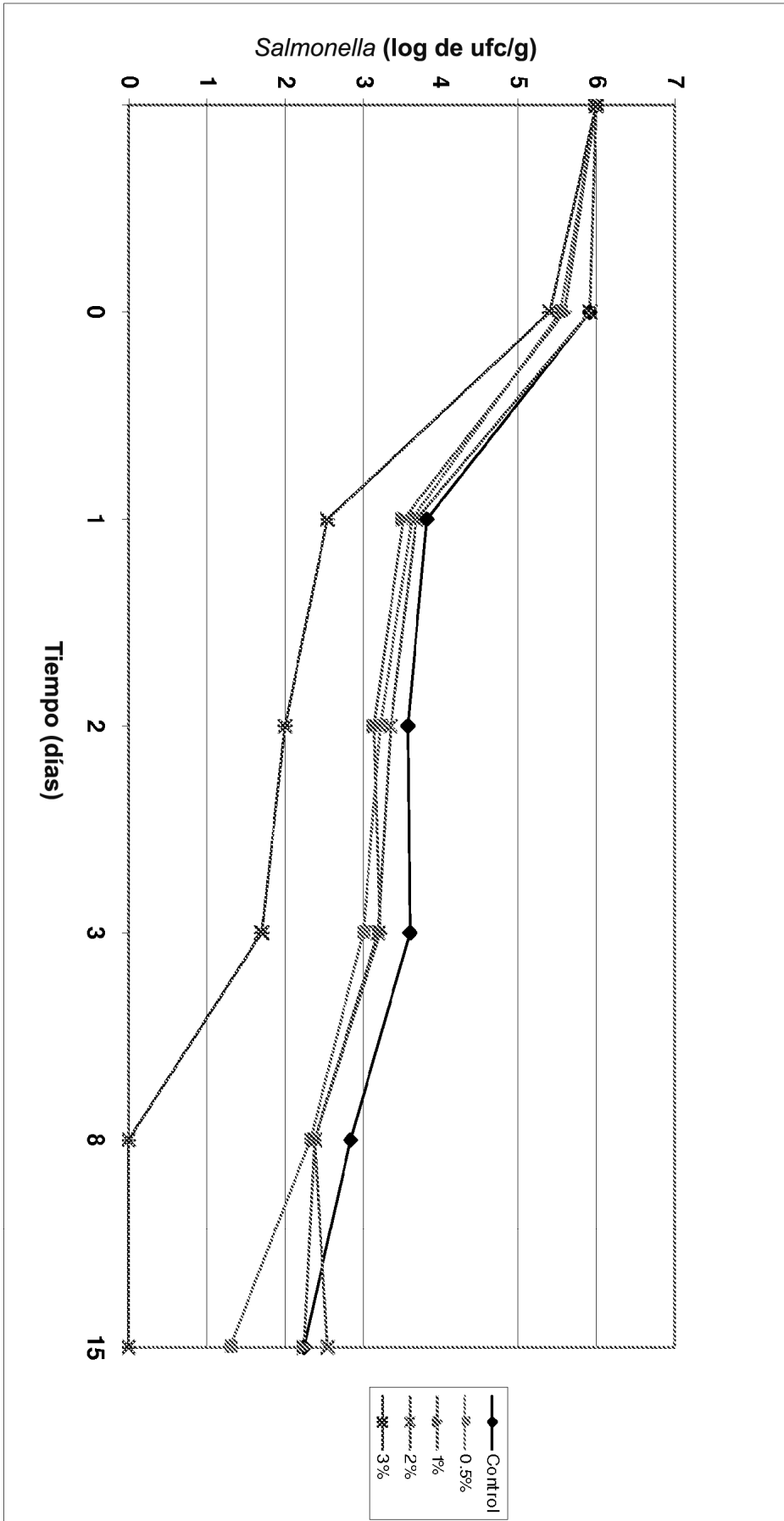


FIGURA 10

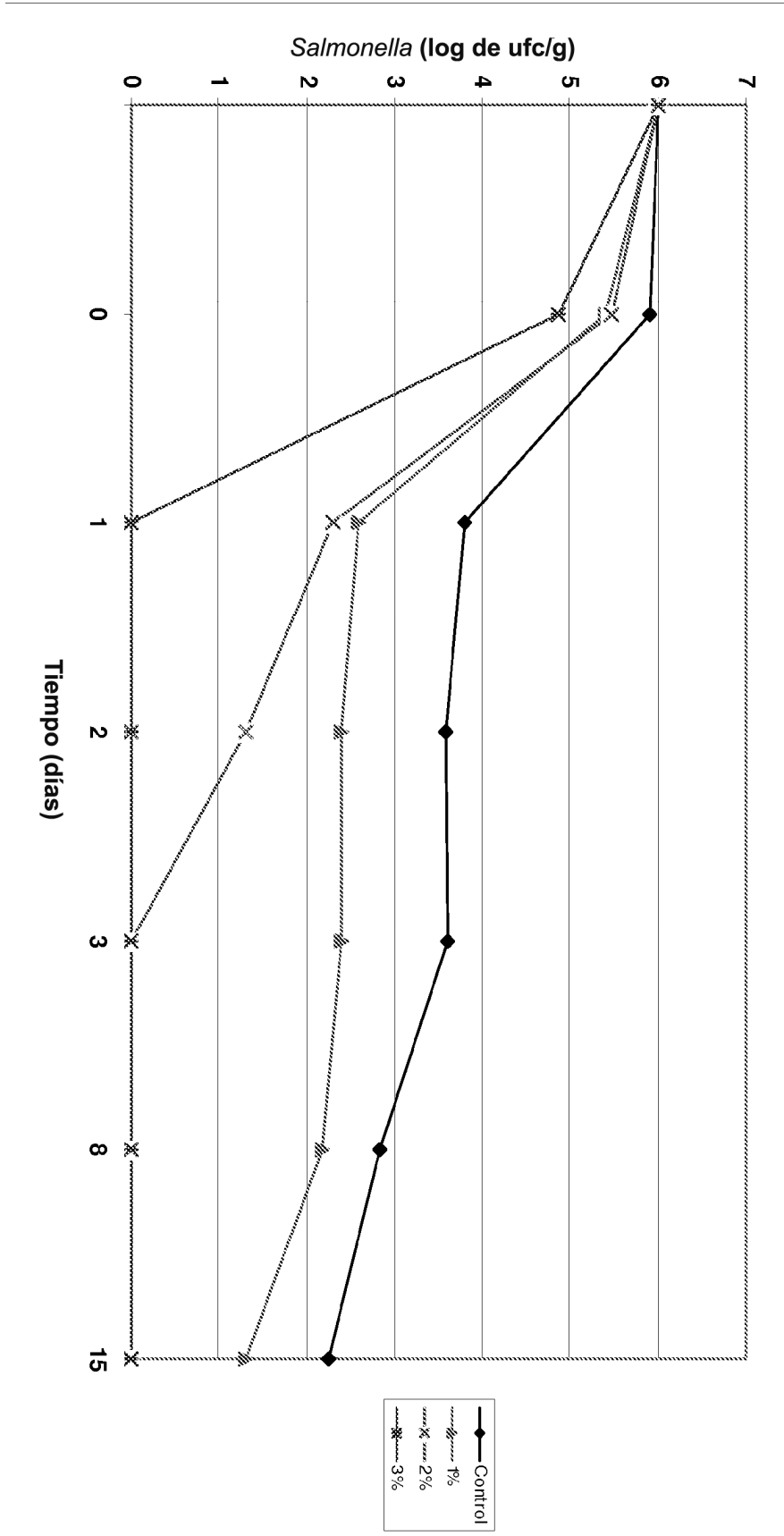


FIGURA 11

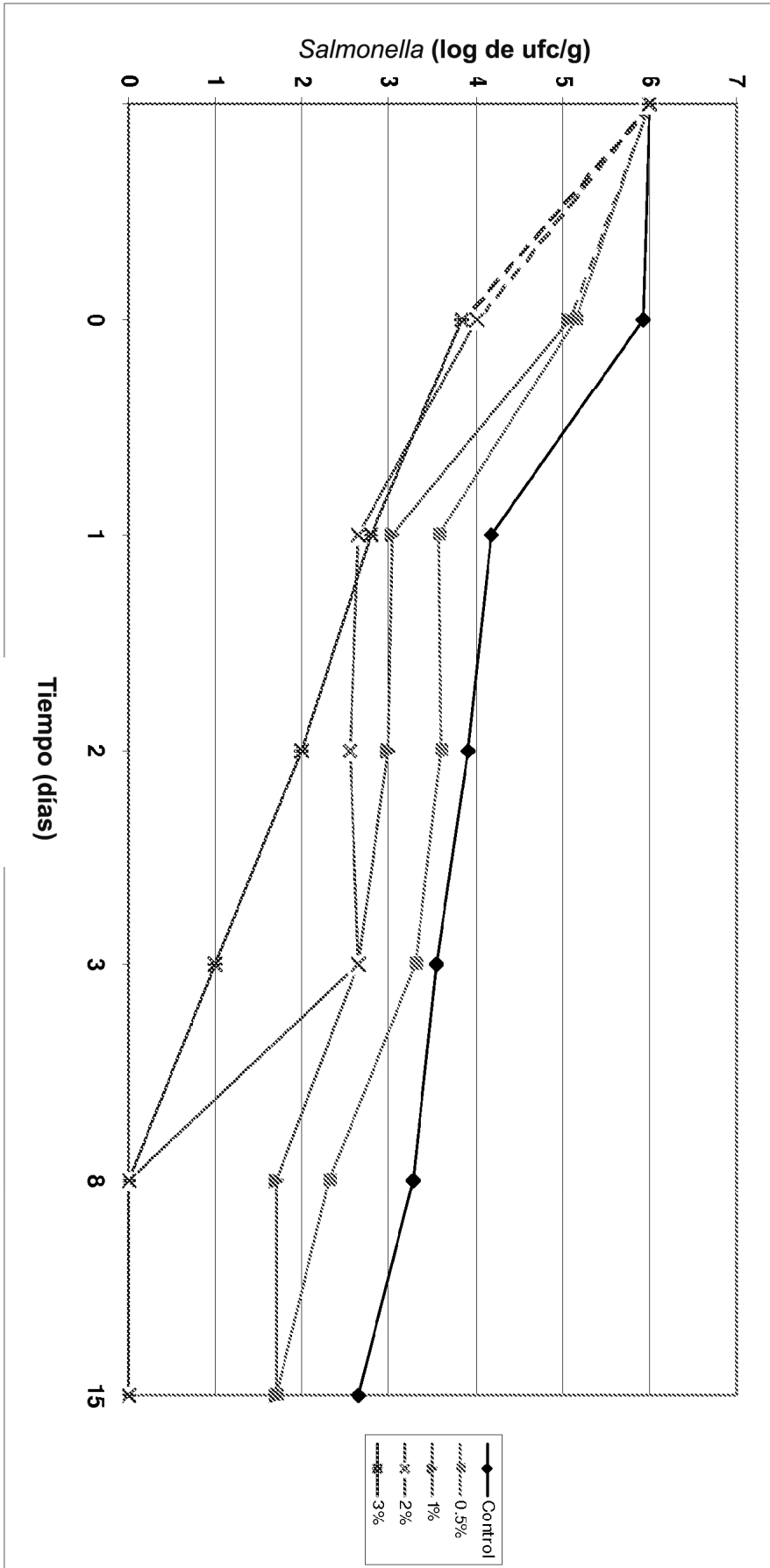


FIGURA 12

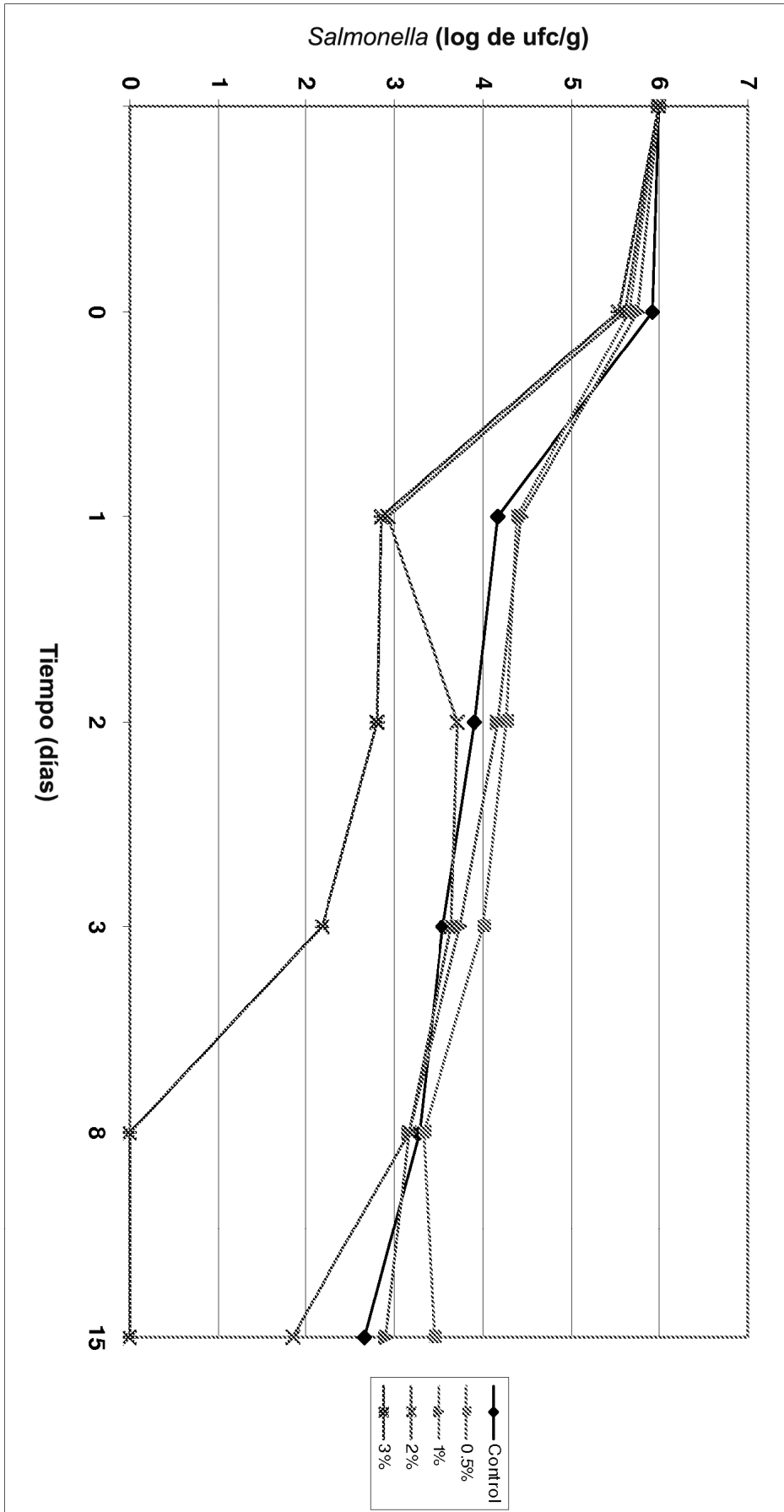


FIGURA 13

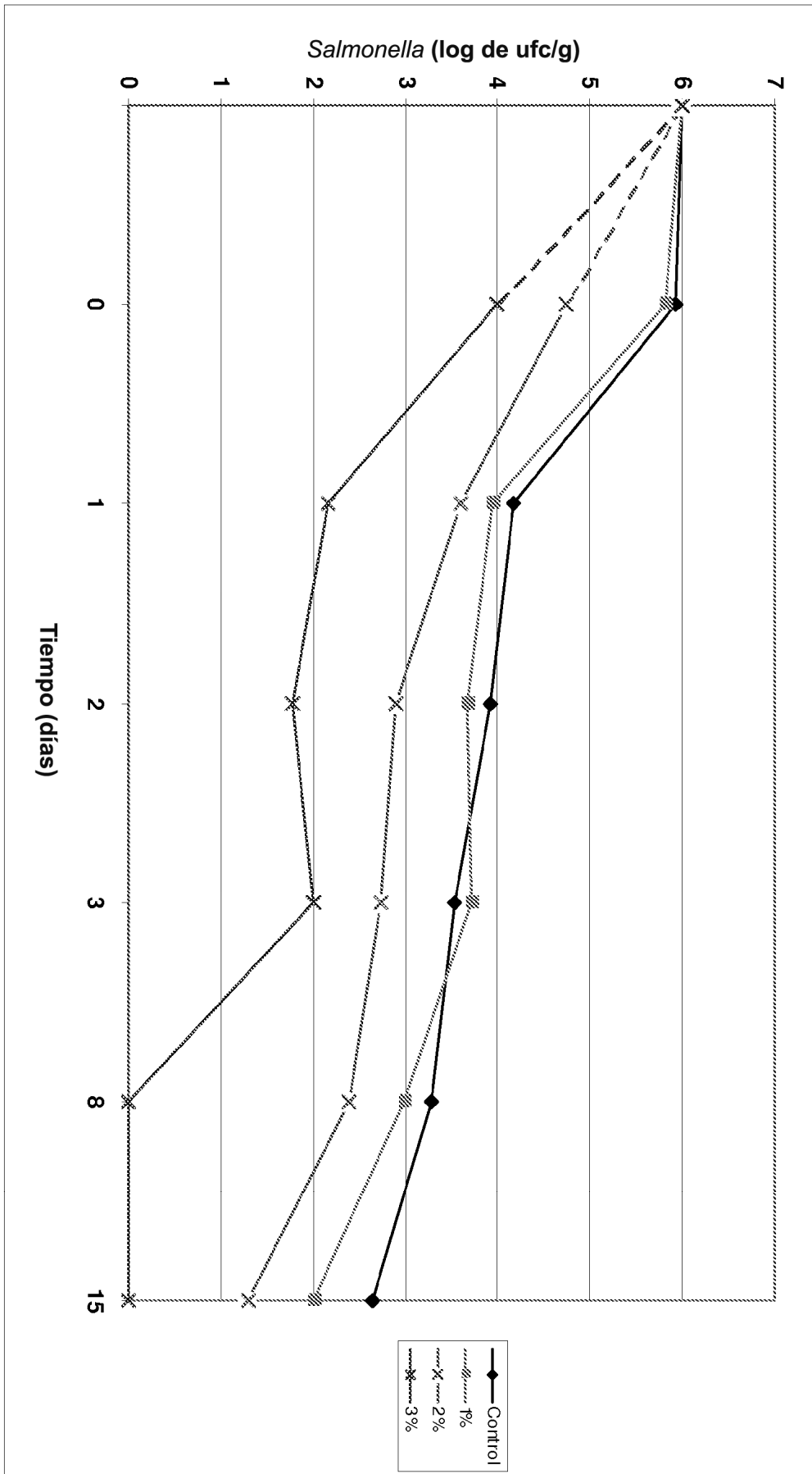


FIGURA 14

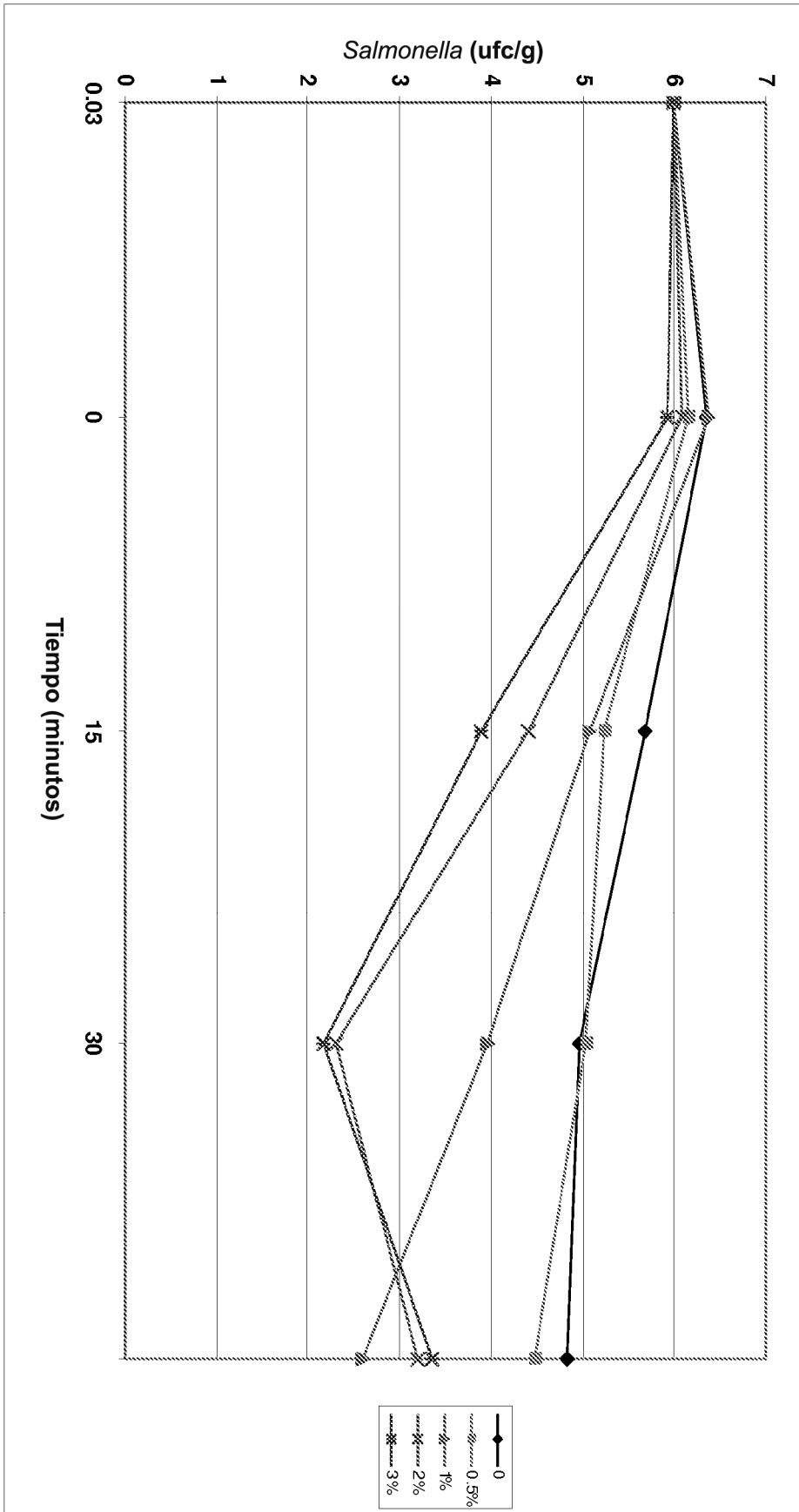


FIGURA 15



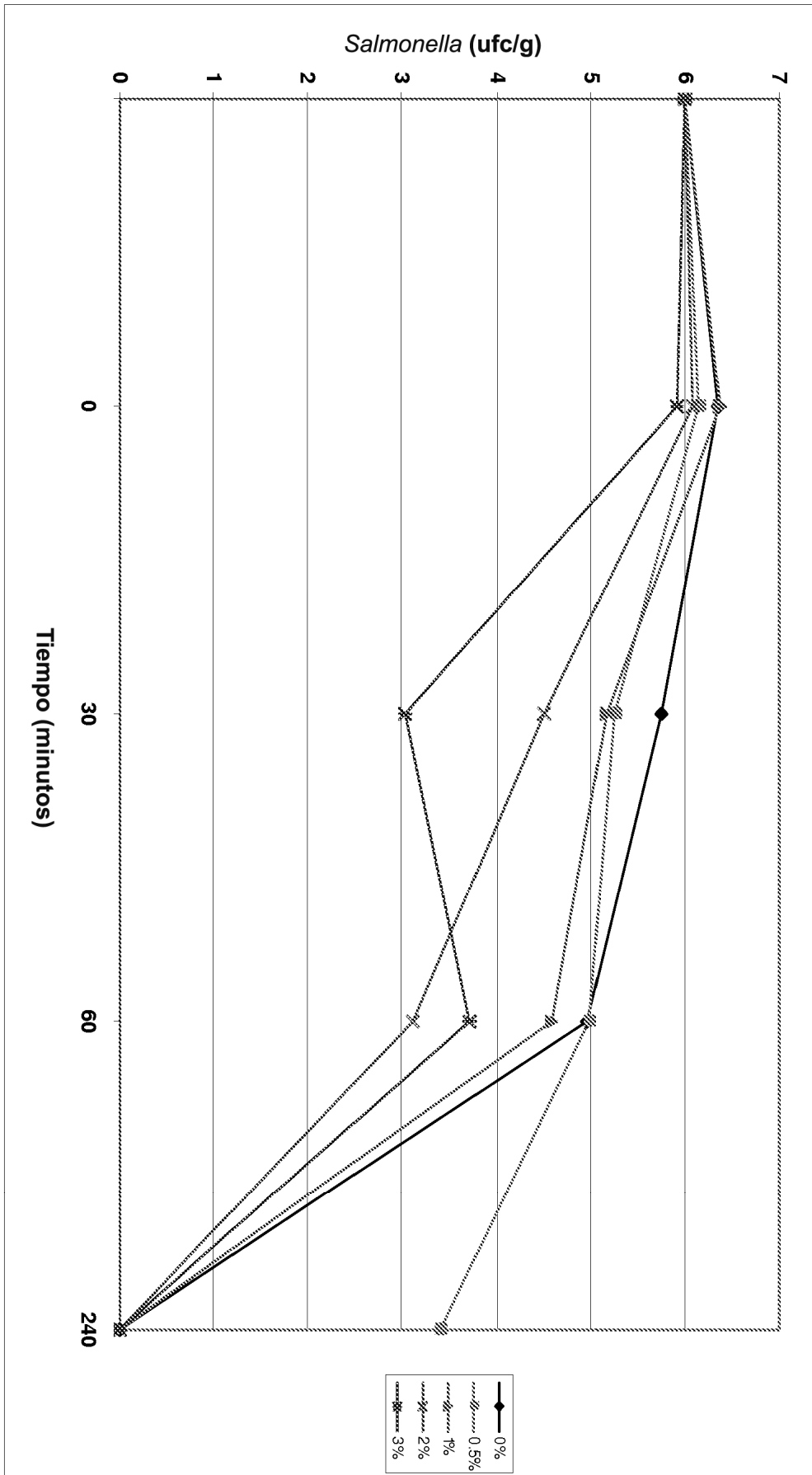


FIGURA 16

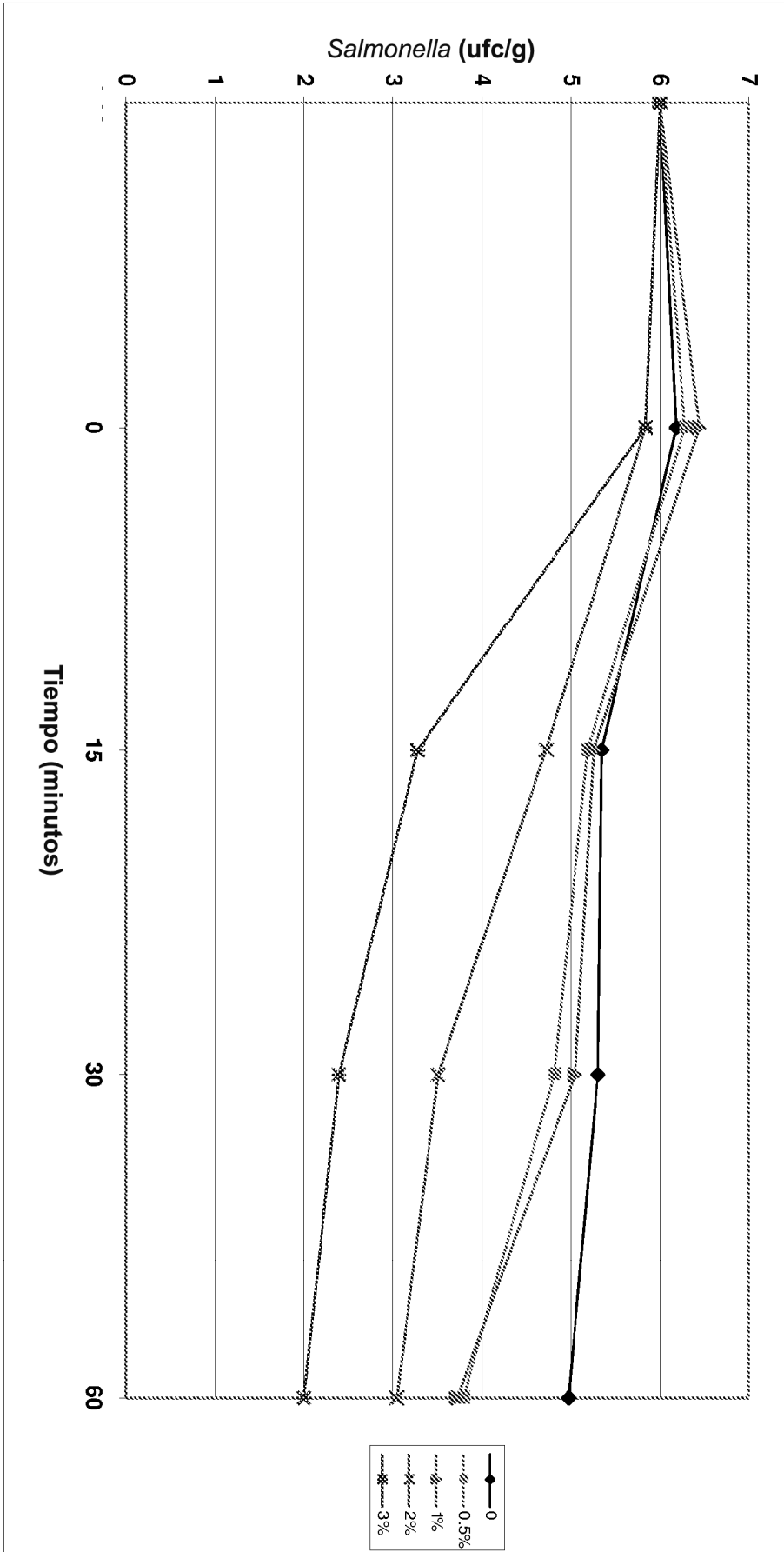


FIGURA 17

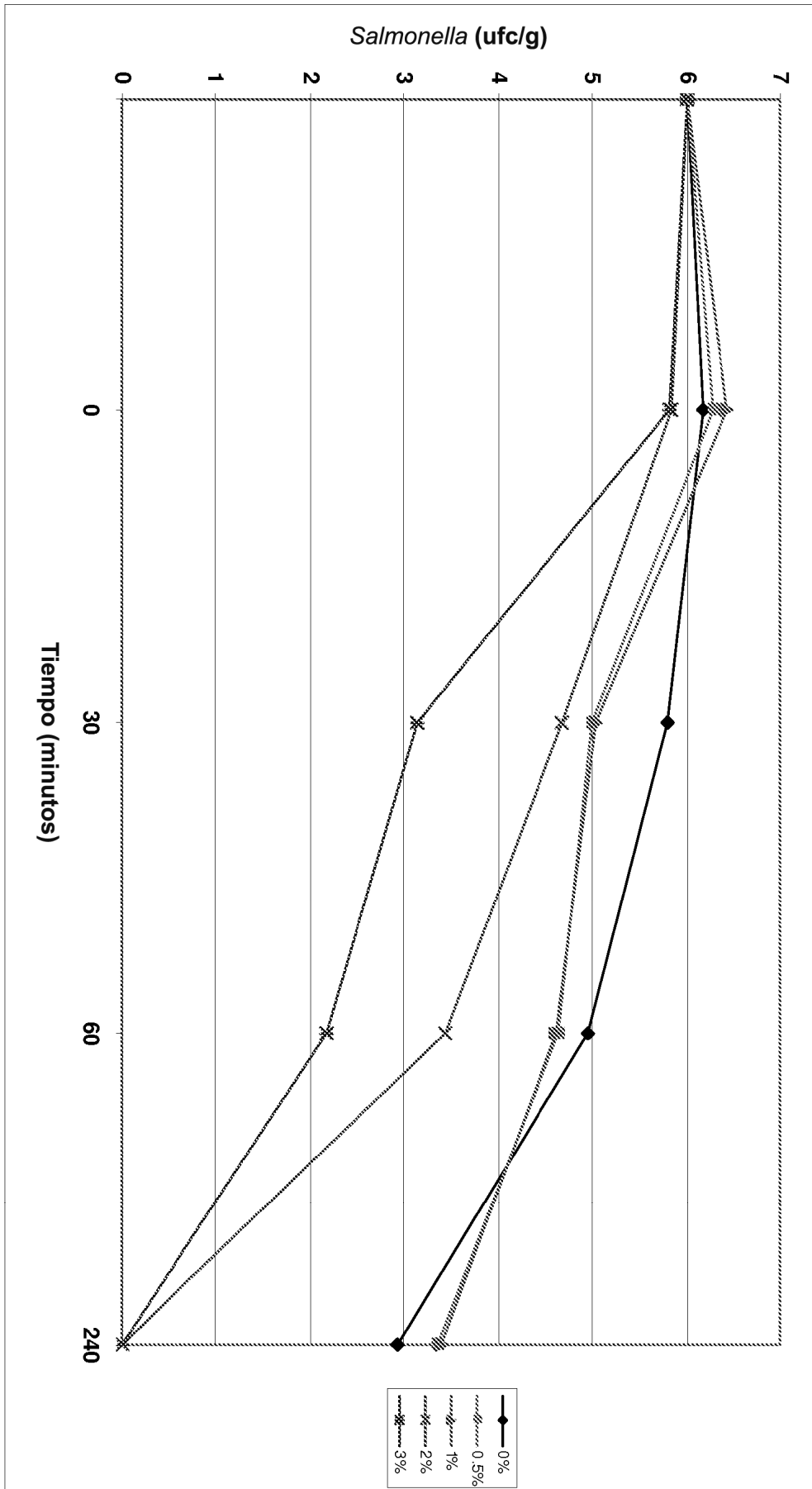


FIGURA 18

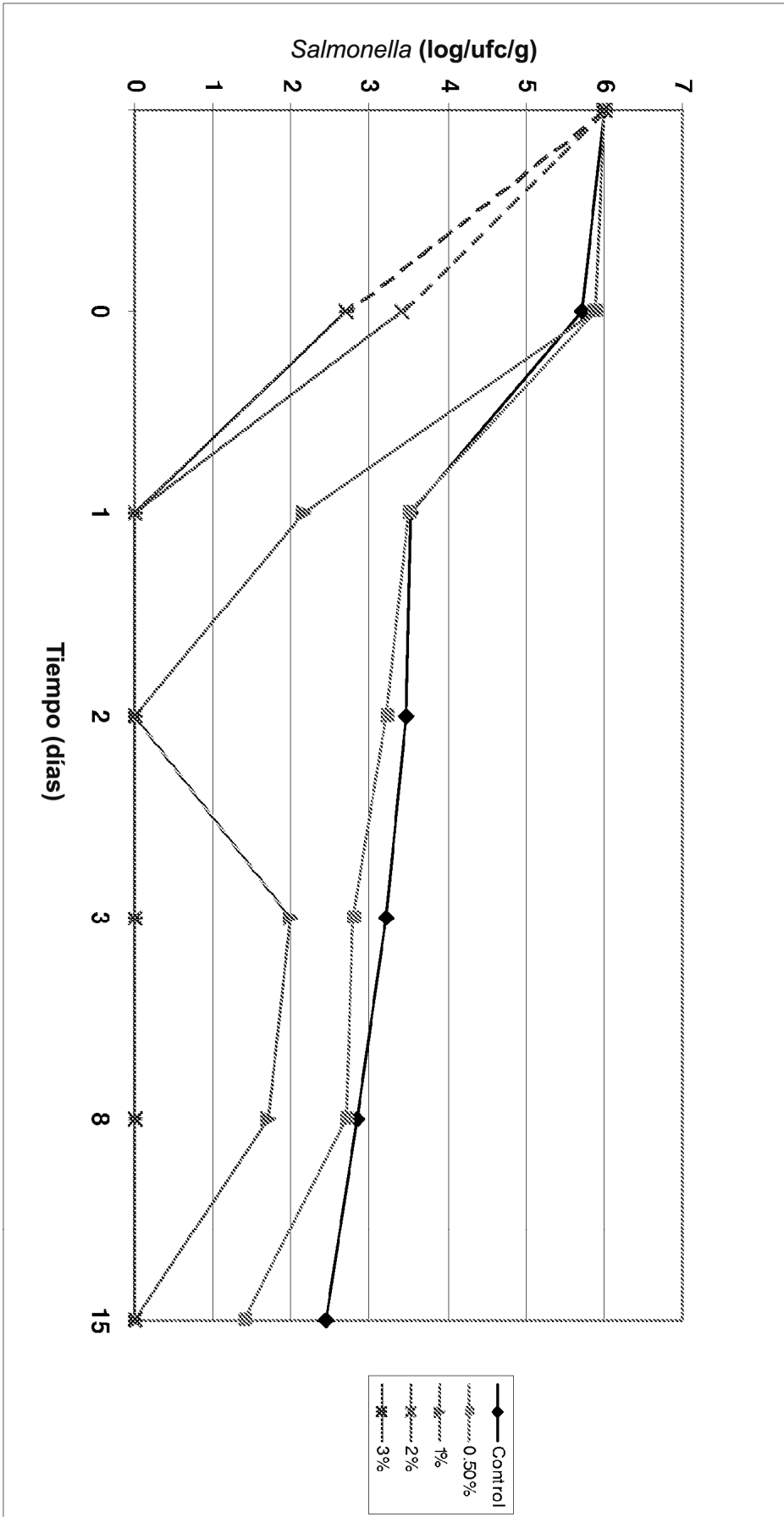


FIGURA 19

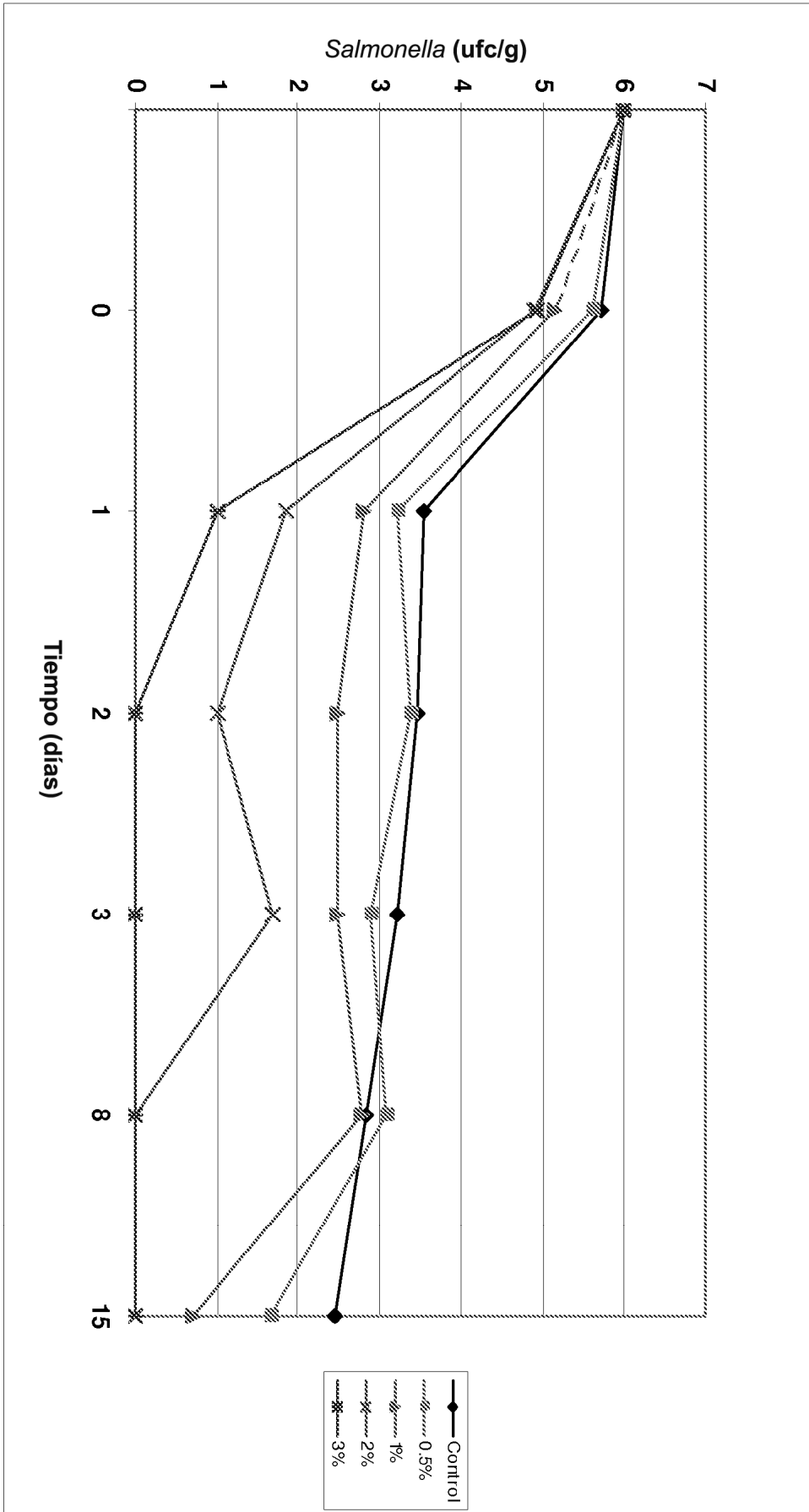


FIGURA 20

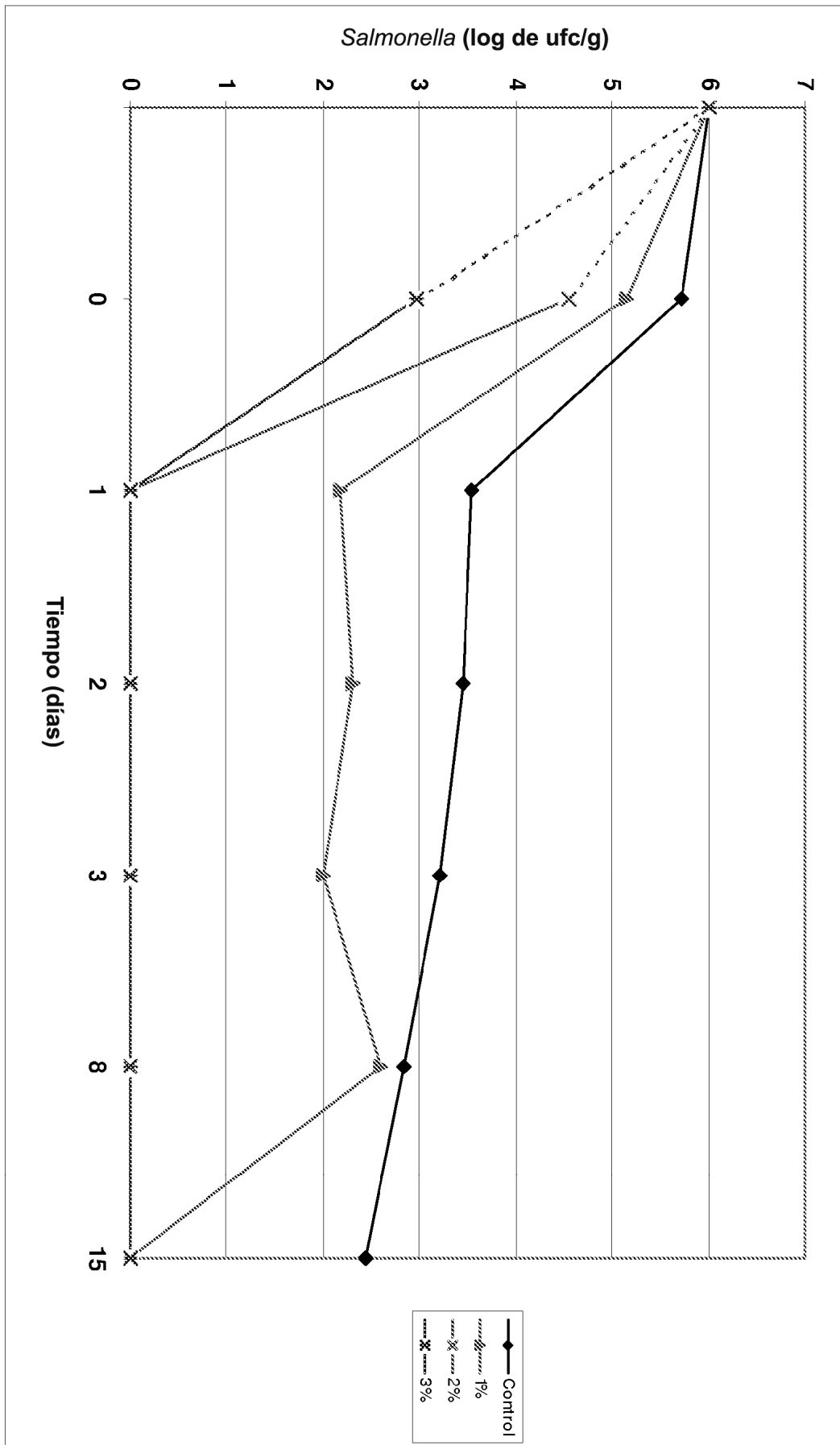


FIGURA 21

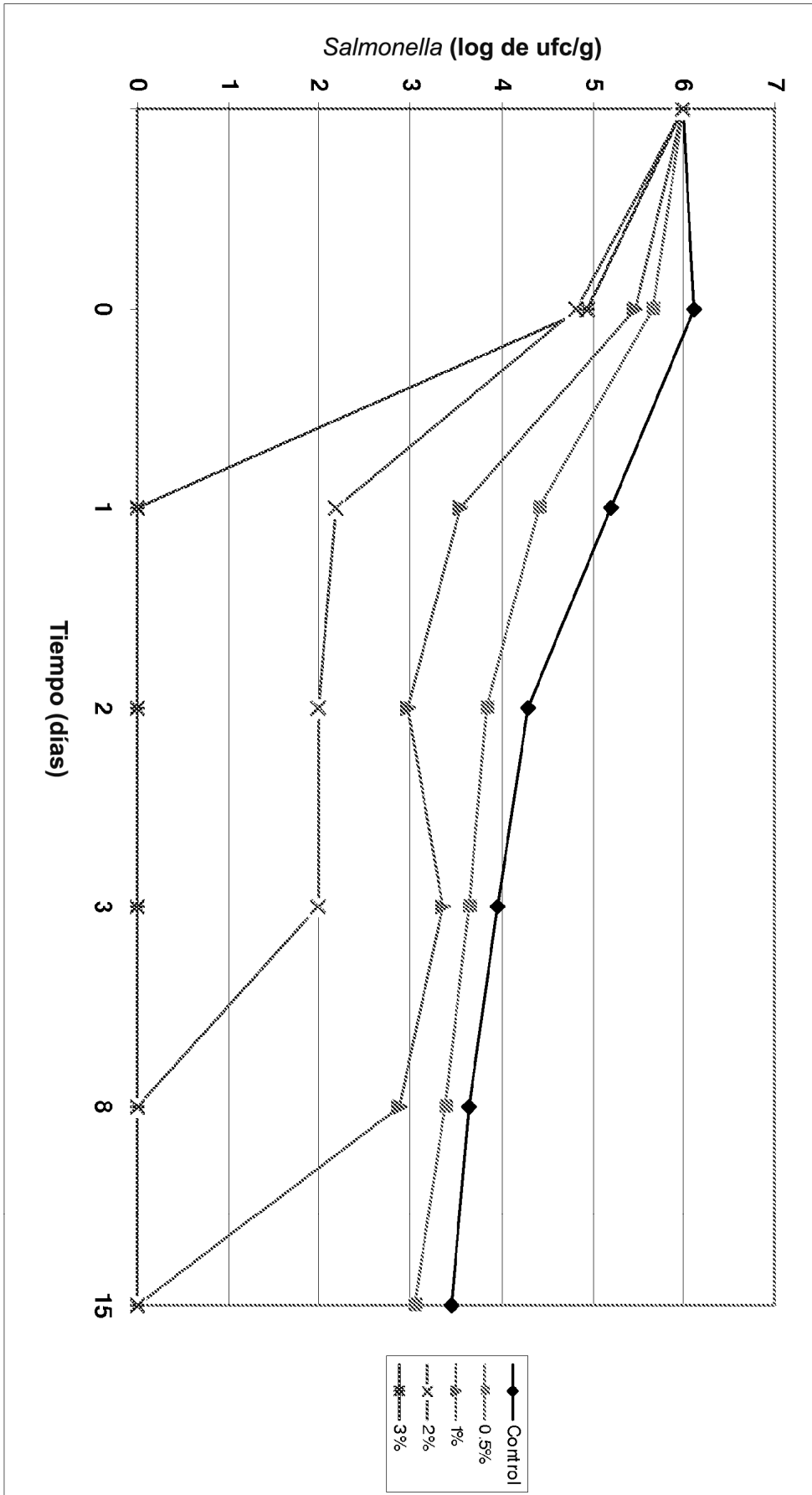


FIGURA 22

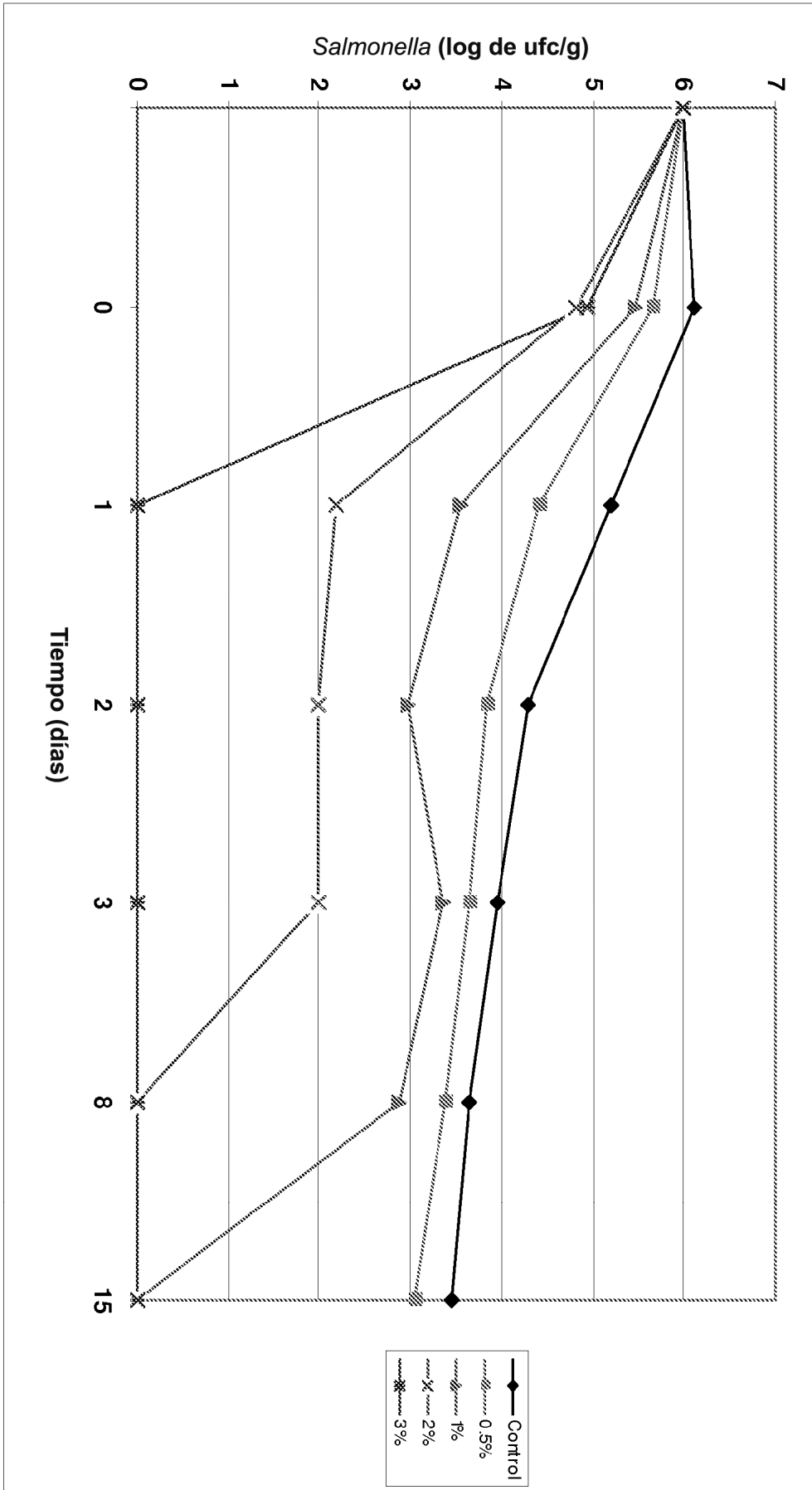


FIGURA 23



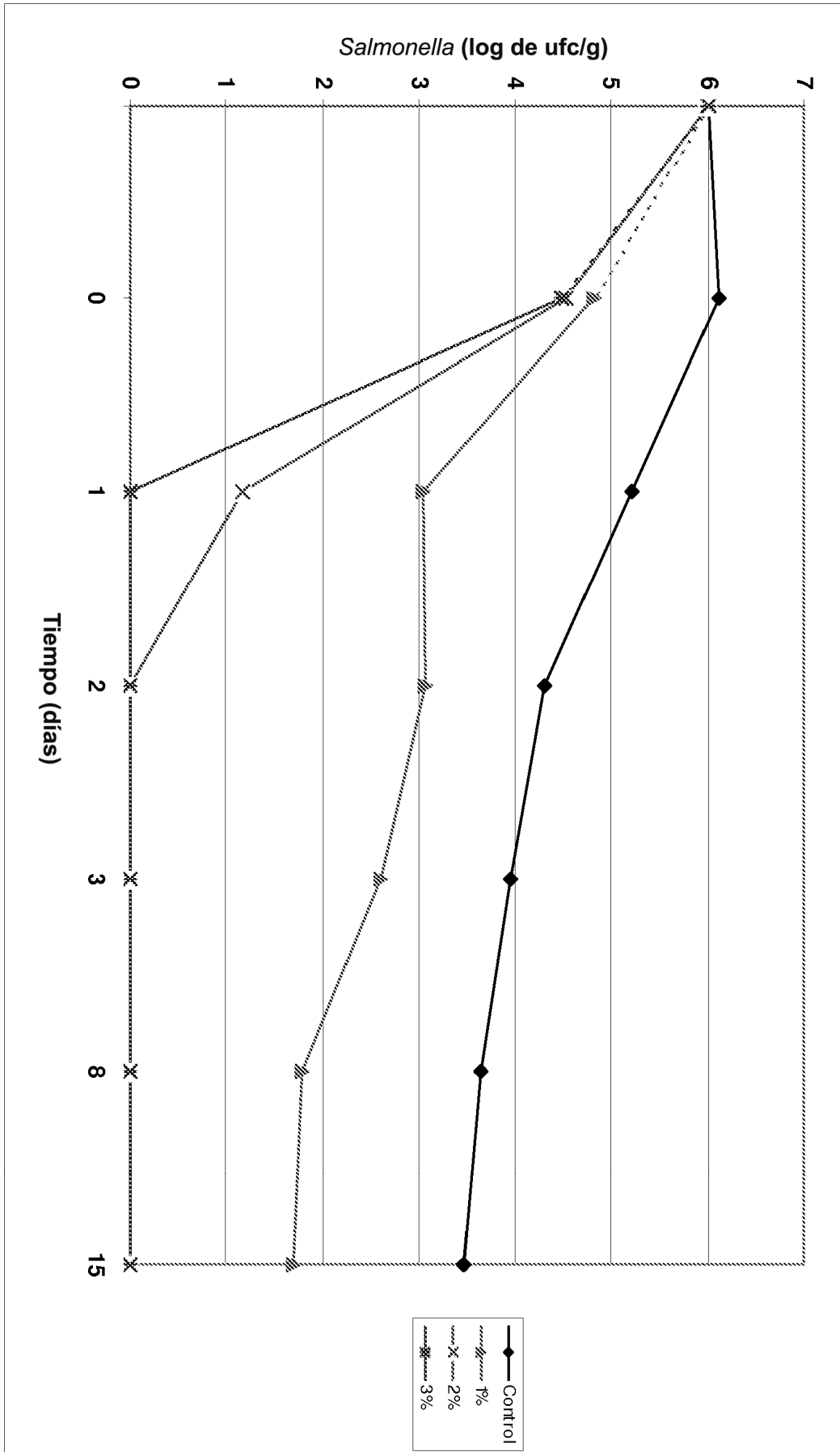


FIGURA 24

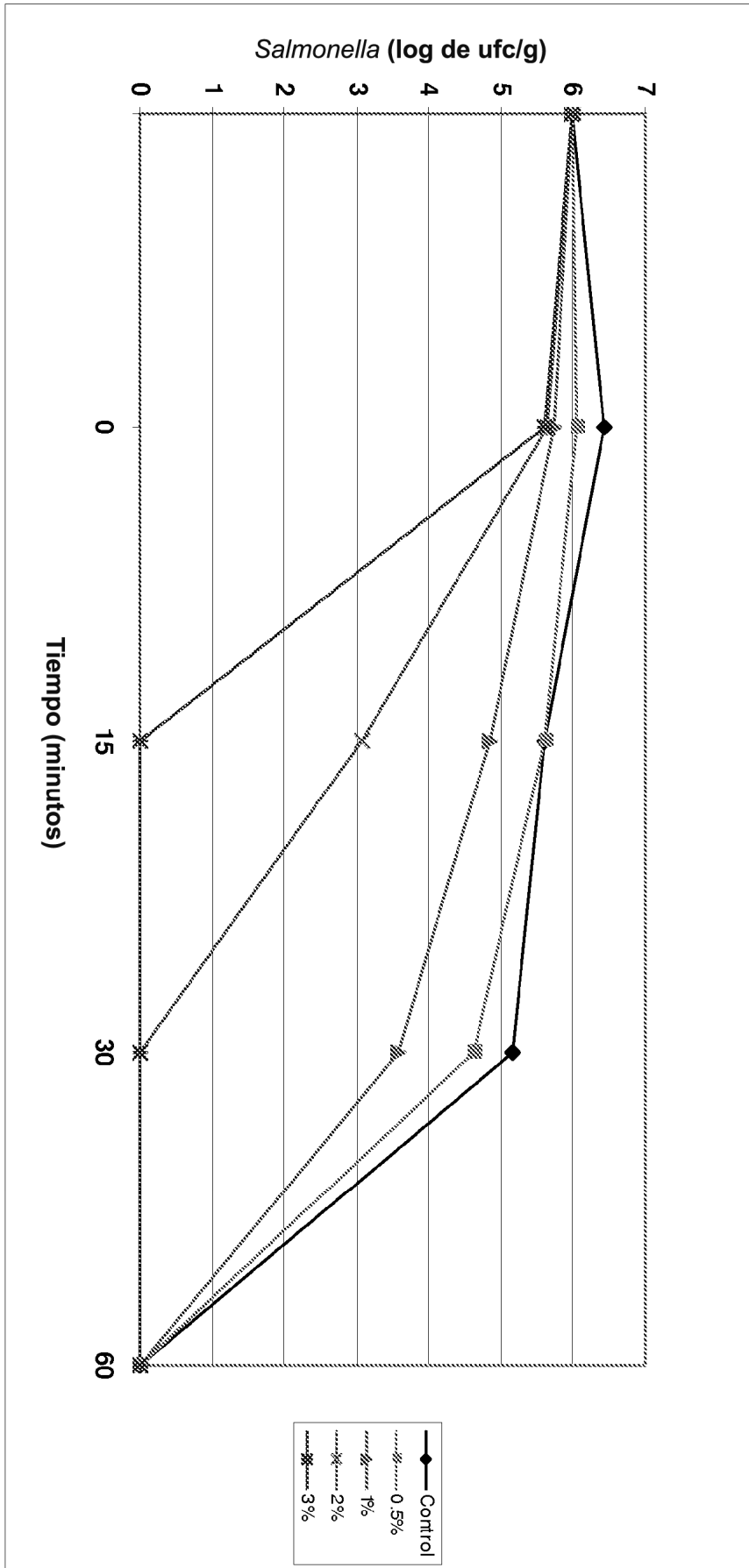


FIGURA 25

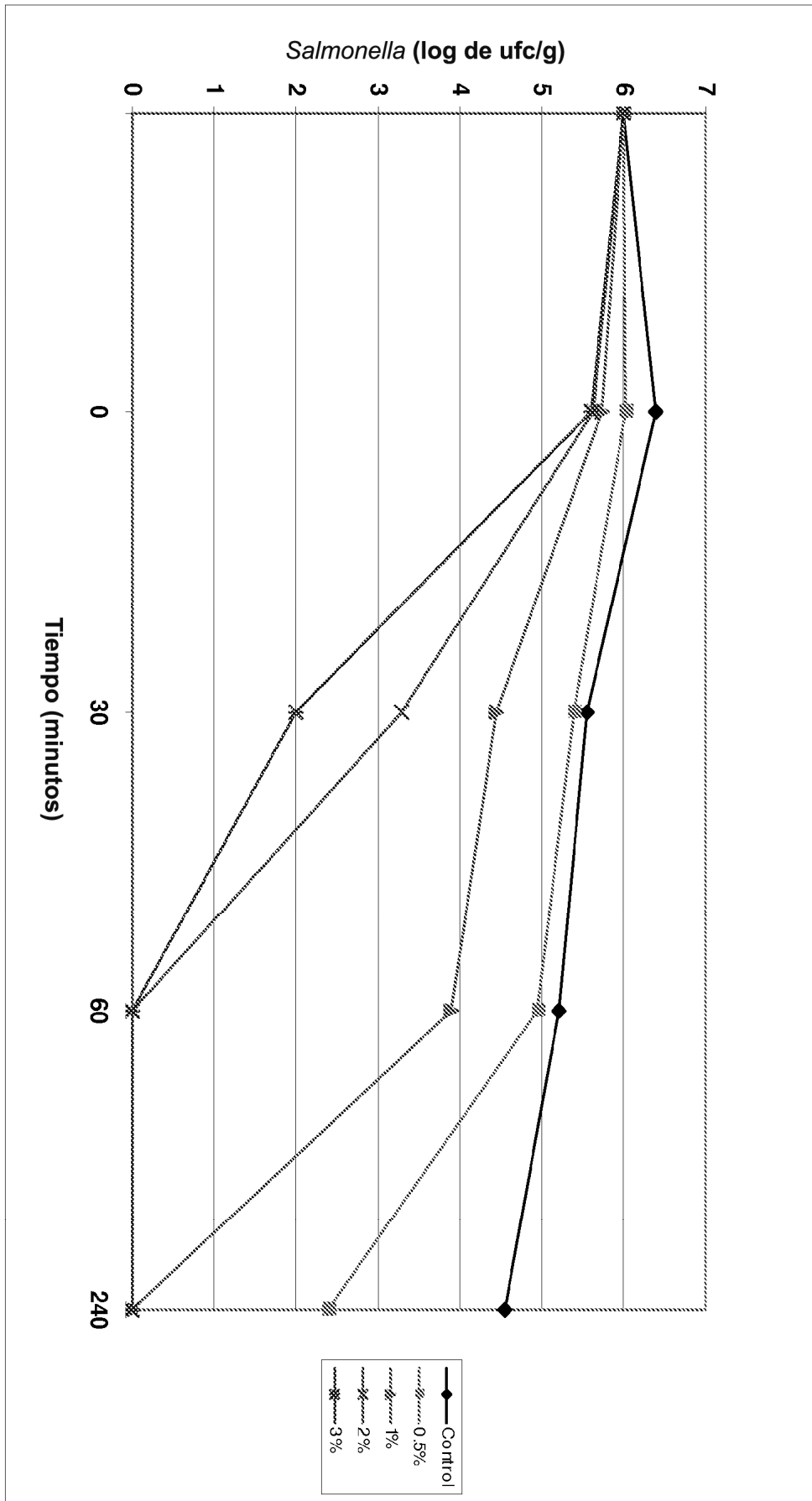


FIGURA 26

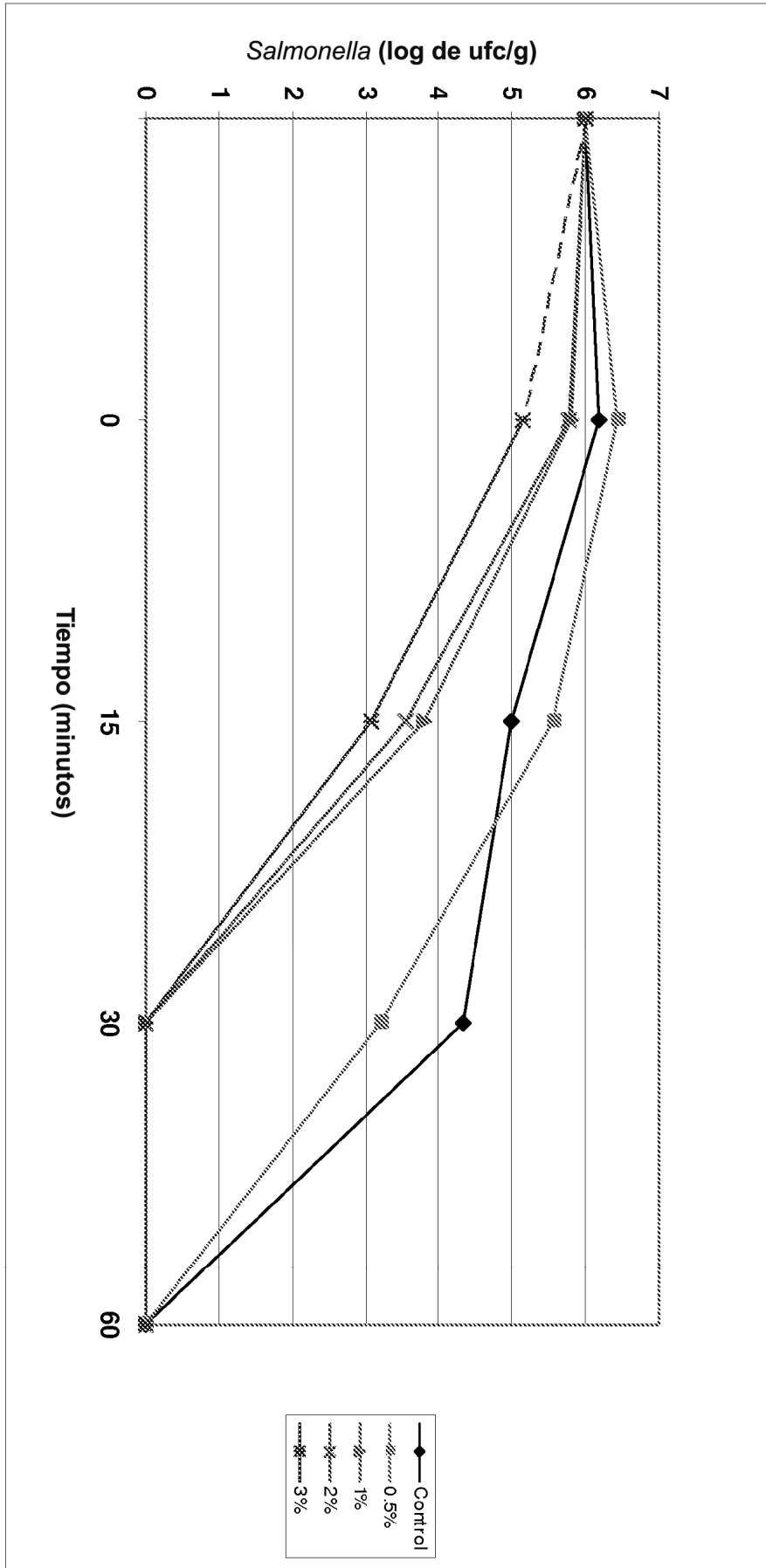


FIGURA 27

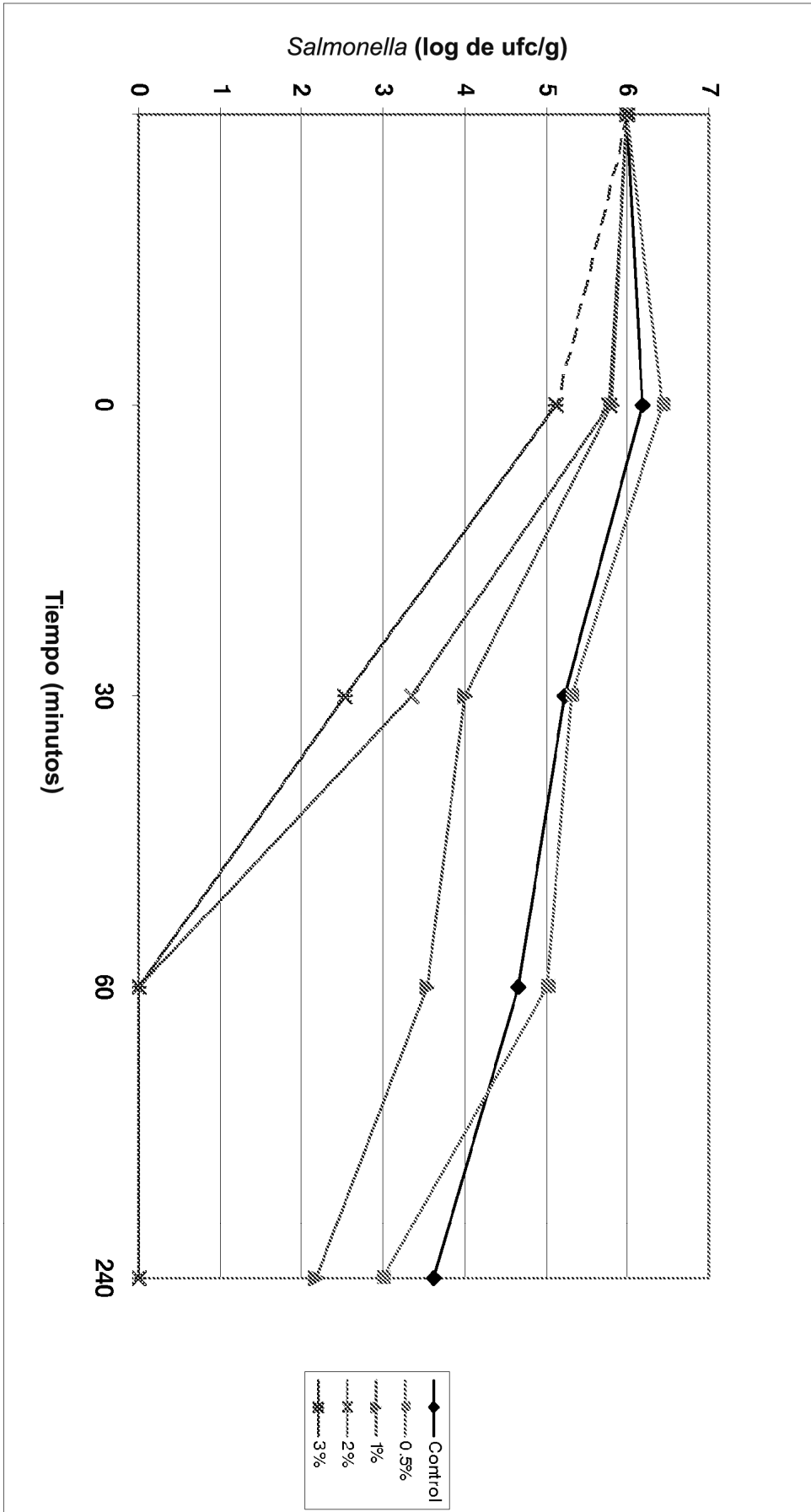


FIGURA 28