

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 566**

51 Int. Cl.:

<b>A23K 20/195</b>	(2006.01)	<b>A23L 3/3535</b>	(2006.01)
<b>A23K 20/10</b>	(2006.01)	<b>A01N 37/02</b>	(2006.01)
<b>A23K 50/00</b>	(2006.01)		
<b>A01N 31/00</b>	(2006.01)		
<b>A23L 3/3463</b>	(2006.01)		
<b>A23L 3/3472</b>	(2006.01)		
<b>A23K 20/105</b>	(2006.01)		
<b>A23K 20/111</b>	(2006.01)		
<b>A23K 20/121</b>	(2006.01)		
<b>A23L 3/3508</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2010** **E 15201119 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016** **EP 3023009**

54 Título: **Conservante del agua y los alimentos**

30 Prioridad:

**06.08.2009 US 231930 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.06.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**PIMENTAL, JULIO;  
RICHARDSON, KURT y  
WILSON, JAMES**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 618 566 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

Conservante del agua y los alimentos

## ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

## CAMPO DE LA INVENCIÓN

- 5 Un método para prolongar la vida útil del agua, piensos e ingredientes principales para piensos tratando por pulverización o combinando una mezcla de ácidos orgánicos que contiene ácido pelargónico.

## ANTECEDENTES

- 10 Las enfermedades transmitidas por los alimentos son problemas comunes para millones de personas en todo el mundo. Las enfermedades transmitidas por los alimentos son provocadas por muchos microorganismos diferentes, incluyendo infecciones por *Campylobacter spp.*, *Shigella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Yersenia enterocolitica*, *Salmonella spp.* y *E. coli* que prevalecen en muchos países. Estadísticas CDC en los Estados Unidos sugieren que 76 millones de personas enferman cada año debido al consumo de carne mal cocida, huevos, mariscos, productos lácteos no pasteurizados y verduras sin lavar. Los animales productores de alimentos son el depósito principal de serotipos no typhi de *Salmonella enterica*, lo que provoca una estimación de 1.4 millones de enfermedades, 16.400 hospitalizaciones y 580 muertes/año en Estados Unidos.

15 *Salmonella* es un patógeno facultativo, intracelular, capaz de infestar a seres humanos y animales resultando en infección. Después de la ingestión, *Salmonella* puede escapar de los confines del intestino, puede penetrar en el intestino y puede ser transportada por la sangre a los 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 salmonelosis en seres humanos aparecen debido al consumo de huevos de gallina. Dos días después de exponer gallinas por vía oral a *Salmonella*, las bacterias se pueden detectar en el bazo, el hígado, el corazón, los tejidos de la vesícula biliar, los tejidos intestinales y diversas 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 huevos ayudan a mantener bajos los niveles de *Salmonella* en huevos recién puestos (0,6% de incidencia), incluso a pesar de que los huevos del oviducto de la misma gallina mostraron niveles más altos de salmonella (29% de incidencia); estos factores pueden incluir anticuerpos, enzimas antibacterianas y proteínas secuestrantes de hierro e inhibidoras de la proteasa bacteriana en la yema y la 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 en función del tipo de ingredientes utilizados en la fabricación de piensos para animales. Hay una mayor incidencia de *Salmonella* en alimentos para animales suministrados (35%) que en los alimentos de origen vegetal (5%). La incidencia de *E. coli* es similar en los alimentos derivados tanto de animales como de plantas (40%), pero la incidencia de *Enterococcus* es del 80% en los alimentos animales y del 91% en los alimentos derivados de las plantas. La incidencia de contaminación por *Salmonella* en los piensos animales es mayor en forma de pasta que en forma de gránulos. La granulación en condiciones de alta temperatura y alta presión reduce el número no solo de *Salmonella*, sino también de otras bacterias. Un problema con una simple granulación es que no hay protección contra la recontaminación microbiana de los piensos antes de su consumo por el animal tal como en el ensacado, transporte y alimentadores.

- 40 La presencia de diarreas en terneros tiene una importancia económica. Más del 90% de las diarreas en los terneros se produce por *E. coli* y *Salmonella* y *Clostridia*. Se conocen métodos preventivos tales como (1) la vacunación de las madres con el fin de transferir pasivamente anticuerpos en el calostro; (2) el uso de suplementos inmunes para los sustitutos de la leche; (3) el uso de probióticos para crear un entorno saludable en el tracto gastrointestinal, y (4) cambios en la cría. Ninguna de estas medidas protectoras son 100% eficaces.

- 45 La incidencia de la diarrea en los neonatos y los lechones destetados es también muy alta. Una vez más, *E. coli* y *Salmonella* son los principales microorganismos implicados en la diarrea en cerdos. Uno de los métodos preferidos para la prevención de este problema es el destete precoz segregado (SEW). La base del destete precoz es que cuanto antes los lechones sean destetados de la cerda, menor será la probabilidad de enfermedades de cruce entre la cerda y los lechones. Tanto en la diarrea de los terneros como de los cochinitos, el método preferido de tratamiento es con antibióticos.

- 50 La Comunidad Europea (UE) ha prohibido el uso de cinco antibióticos y la FDA en los Estados Unidos está prohibiendo el uso de fluoroquinolona en los animales debido al desarrollo de resistencia a este antibiótico. La

resistencia bacteriana ha fomentado el desarrollo de productos alternativos a los antibióticos. Todos los estados de la UE han prohibido el uso de antibióticos como promotores del crecimiento, y esto se ha extendido a todos los países que exportan carne o sus derivados a la UE.

5 Muchos productos se han desarrollado para la conservación de agua y piensos para animales, incluidos los aditivos en agua, tales como los productos de amonio cuaternario, productos a base de clorito, la cloración, dióxido de cloro y ácidos orgánicos (ácido acético, sorbato, ascórbico, cítrico, fórmico).

10 Métodos para la conservación de los piensos incluyen tratamiento térmico, ácidos orgánicos, formaldehído, aceites esenciales e irradiación. La eliminación de *Salmonella* con ácidos orgánicos requiere altos niveles de tratamiento, lo que implica un alto costo para la industria animal. La irradiación de los piensos no es rentable y no es respetuosa del consumidor. El percarbonato de sodio es un oxidante potente que se utiliza como un agente antimicrobiano en piensos a concentraciones de 1 - 2% de la dieta.

15 Se recomienda el tratamiento con clorato para *E coli* y *Salmonella*, ya que estas bacterias tienen la enzima nitrato reductasa que reduce clorato a clorito, que tiene propiedades antimicrobianas. Cuando se les administró iones clorato a cerdos expuestos a *Salmonella* a través del agua antes de la matanza, habían reducido el recuento de bacterias en el contenido del intestino y tejido linfático (Anderson, R.C. et. al. 2004, *Effect of drinking-water administration of experimental chlorate ion preparations on Salmonella entérica serovar Typhimurium colonization in weaned and finished pigs*, Vet. Res. Comm. 28(3): 179-189).

20 Los ácidos orgánicos han sido un aditivo principal para reducir la incidencia de infecciones transmitidas por los alimentos. Se ha informado que el uso de ácidos grasos de cadena corta, mediana y larga, p. ej., fórmico, propiónico, butírico, láctico, cítrico, málico y otros tienen éxito en algunos casos. Los ácidos grasos de cadena corta ejercen su actividad antimicrobiana debido a que grupos ácido RCOOH no disociados (no ionizados) son permeables a los lípidos y, por tanto, pueden atravesar la pared celular microbiana y disociarse en el interior más alcalino del microorganismo ( $\text{RCOOH} \rightarrow \text{RCOO}^- + \text{H}^+$ ), haciendo el citoplasma inestable para la supervivencia. El uso de ácidos orgánicos, especialmente ácido fórmico y propiónico, está bien documentado en la técnica. Pero el ácido pelargónico se conoce solo como un herbicida y un fungicida para usos en plantas, no para la preservación del agua y de piensos para animales.

30 El ácido pelargónico es un ácido graso que aparece de forma natural que se encuentra en casi todas las especies de animales y plantas. Debido a que contiene nueve átomos de carbono, también se le denomina ácido nonanoico y tiene la fórmula química  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ . Se encuentra en niveles bajos en muchos alimentos comunes y se descompone fácilmente en el medio ambiente. Es un líquido incoloro oleoso que solidifica a temperaturas bajas. Tiene un olor rancio desagradable y es casi insoluble en agua.

35 El ácido pelargónico se utiliza 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, de post-emergencia o herbicida desecante producido por Mycogen/Dow Chemicals. El modo de acción herbicida del ácido pelargónico se debe en primer lugar a la filtración de la membrana en la oscuridad o la luz, y en segundo lugar a la peroxidación impulsada por radicales formados en la luz por la clorofila sensibilizada desplazada de la membrana tilacoide (B. Lederer, T. Fujimori., Y. Tsujino, K. Wakabayashi y 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 Microsporium gypseum* Mycoses Vol. 44, Número 3-4 págs. 109-112, 2001) demostraron que la concentración inhibitoria mínima (MIC) para prevenir el crecimiento de *M. gypseum* en medios sólidos era 0,02 mg/ml de ácido cáprico y 0,04 mg/ml de ácido pelargónico. En medios líquidos era de 0,075 mg/ml de ácido cáprico y 0,05 mg/ml de pelargónico. Estos ácidos se ensayaron de forma independiente y no como una mezcla.

45 N. Hirazawa, et al. (*Antiparasitic effect of medium-chain fatty acids against ciliated Crptocaryon irritans infestation in the red sea bream Pagrus major*, Aquaculture, 198:219-228, 2001) encontraron que el ácido nonanoico, así como los ácidos grasos  $\text{C}_6$  a  $\text{C}_{10}$  eran eficaces en el control del crecimiento del parásito *C. irritans* y que  $\text{C}_8$ ,  $\text{C}_9$  y  $\text{C}_{10}$  eran los más potentes.

50 Se encontró que *Trichoderma harzianum*, un biocontrol para plantas de cacao, produce ácido pelargónico como uno de muchos productos químicos, y era eficaz en el control de la germinación y el crecimiento de patógenos del 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).

La solicitud de patente publicada US2004/0266852, describe un fungicida para usos agrícolas compuesto de uno o más ácidos grasos y uno o más ácidos orgánicos diferentes a partir 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.

5 La Patente de EE.UU 5.366.995 describe un método para erradicar infecciones fúngicas y bacterianas en las plantas y para potenciar la actividad de los fungicidas y bactericidas en plantas por los ácidos grasos y sus derivados con una formulación que contiene 80% de ácido pelargónico o sus sales para el control de hongos en plantas. Los ácidos grasos utilizados principalmente tienen cadenas de 9 a 18 carbonos.

10 La Patente de EE.UU. 5.342.630 describe un plaguicida para usos en plantas que contiene una sal inorgánica que potencia la eficacia de ácidos grasos de cadena 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 carbonato de potasio.

15 La Patente de EE.UU. 5.093.124 describe un fungicida y artropodocida para plantas que comprende ácidos mono-alfa-carboxílicos y sus sales que tienen una fitotoxicidad reducida. Preferiblemente, un fungicida con una cadena de 9 a 10 átomos de carbono al menos, parcialmente neutralizado por un metal alcalino activo tal como potasio. La mezcla comprende 40% de ingrediente activo disuelto en agua e incluye 10% de pelargónico, 10% de ácido cáprico y 20% de ácidos grasos de coco, todos los cuales se neutralizan con hidróxido de potasio.

La Patente de EE.UU. 6.596.763 describe un método para controlar la infección de la piel que comprende ácidos grasos de cadena de 6 a 18 carbonos o sus derivados.

20 La Patente de EE.UU. 6.103.768 y la Patente de EE.UU. 6.136.856 describen la utilidad única de ácidos grasos y derivados de erradicar infecciones existentes por hongos y bacterias en plantas. Este método no es preventivo, pero mostró efectividad en infecciones establecidas. Sharpshooter, un producto disponible en el mercado, con 80% de ácido pelargónico, 2% de emulsionante y 18% de tensioactivo mostró eficacia contra *Penicillium* y *Botrytis spp.*

25 La Patente de EE.UU. 6.638.978 describe un conservante antimicrobiano compuesto de un éster de ácido graso de glicerol, una mezcla binaria de ácidos grasos (cadenas de 6 a 18 carbonos) y un segundo ácido graso (cadenas de 6 a 18 carbonos), en donde el segundo ácido graso es diferente del primer ácido graso, para la conservación de alimentos.

El documento WO 01/97799 describe el uso de ácidos grasos de cadena media como agentes antimicrobianos. Esto demuestra que un aumento en el pH de 6,5 a 7,5 aumenta la MIC de los ácidos grasos de cadena corta que contienen cadenas de 6 – 8 carbonos.

30 El ácido pelargónico se utiliza como un componente en disoluciones desinfectantes de superficie en contacto con alimentos en los establecimientos de manipulación de alimentos. Un producto de EcoLab contiene 6,49% de ácido pelargónico como ingrediente activo a ser utilizado como desinfectante para todas las superficies en contacto con alimentos (12 CFR 178.1010 b).

35 La FDA ha autorizado el ácido pelargónico como agente saborizante de alimentos sintético (21 CFR 172.515), como adyuvante, auxiliar de la producción y desinfectante a ser utilizado en contacto con alimentos (12 CFR 178.1010 b) y en el lavado o para ayudar en el pelado con lejía de frutas y verduras (12 CFR 173.315).

El ácido pelargónico aparece listado por el USDA en la lista de USDA de Sustancias Autorizadas, 1990, sección 5.14, Compuestos para el Lavado de Frutas y Verduras.

## SUMARIO DE LA INVENCION

40 El objeto de la invención es proporcionar una composición antimicrobiana para prolongar la vida útil de agua, piensos o ingredientes para piensos según se reivindica en las reivindicaciones 1 a 10.

45 Además, la solicitud se refiere a la provisión de una composición antibacteriana para prolongar la vida útil de agua, piensos o ingredientes para piensos, que comprende: 1% a 99% en peso de ácidos orgánicos en disolución acuosa, que es una mezcla C<sub>2</sub>:C<sub>9</sub> o C<sub>3</sub>:C<sub>9</sub> de ácidos orgánicos tamponados a un pH = 1-5; 0 a 20% en peso de terpenos y 0,5 - 10% de tensioactivos; en donde la concentración de ácido de C<sub>9</sub> es de 2 a 20% en peso, basado en el contenido total de ácido orgánico.

Además, la solicitud se refiere a la provisión de un método para prolongar la vida útil de agua, piensos o ingredientes para piensos, que comprende: tratar por aspersión o mezclar al agua, piensos o ingredientes principales para piensos una cantidad efectiva de una composición que comprende 1% a 99% en peso de ácidos orgánicos en disolución acuosa, que es una mezcla C<sub>2</sub>:C<sub>9</sub> o C<sub>3</sub>:C<sub>9</sub> de ácidos orgánicos tamponados a un pH = 1-5; 0

a 20% en peso de terpenos y 0,5 - 10% de tensioactivos; en donde la concentración de ácidos C<sub>9</sub> es de 2 a 20% en peso, basado en el contenido de ácido orgánico total.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones:

5 Un "ácido orgánico" de la invención es un compuesto de ácido carboxílico que tiene una cadena hidrocarbonada C<sub>1</sub> a C<sub>18</sub> lineal o ramificada, p. ej., ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico y ácido pelargónico.

Una "disolución tamponada" es una que resiste cambios en el pH cuando se añaden pequeñas cantidades de un ácido o un álcali. La capacidad de tamponamiento es una medida cuantitativa de la resistencia de una disolución tampón a un cambio del pH con la adición de iones hidróxido. Sistemas tampón de la invención incluyen

10 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  
 NH<sub>4</sub>Cl, NH<sub>4</sub>OH pH 1 a 11

15 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 los mismos. Terpenos preferidos son disulfuro de alilo, timol, citral, eugenol, carvacrol y carvona, o mezclas de los mismos.

20 La expresión "cantidad eficaz" de un compuesto significa la cantidad que es capaz de realizar la función del compuesto, o propiedad para la que se expresa la cantidad eficaz, tal como una cantidad no tóxica pero suficiente para proporcionar un efecto antimicrobiano. Así, una cantidad eficaz puede ser determinada por un experto en la técnica utilizando experimentación de rutina.

Las formulaciones pueden variar no solo en la concentración de los componentes principales, es decir, ácidos orgánicos, sino también en el tipo de terpenos, tipo de tensioactivo y concentración de agua utilizada. La invención puede ser modificada mediante la adición o eliminación de terpenos y tensioactivos de las formulaciones.

25 La expresión "efecto sinérgico" o "sinergia" significa un efecto conservante mejorado cuando se utilizan los ingredientes como una mezcla en comparación con el efecto aditivo esperado sobre la base de cada uno de los componentes utilizados solos.

30 Las composiciones de la presente invención comprenden ácidos orgánicos que tienen 1 a 18 carbonos, que contienen una cantidad efectiva de una mezcla C<sub>2</sub>:C<sub>9</sub> o C<sub>3</sub>:C<sub>9</sub>, resultando en un efecto conservante sinérgico. En general, una disolución acuosa de los ácidos de cadena corta está tamponada a un pH entre 1 y 5, preferiblemente entre pH 1 y 3, entonces el ácido (pelargónico) de C<sub>9</sub> se añade en una cantidad de 2 a 20% en peso junto con terpenos y tensioactivos opcionales y otros aditivos.

35 Terpenos antimicrobianos, extractos vegetales o aceites esenciales que contienen terpenos se pueden utilizar en la invención, así como los terpenos más purificados. Los terpenos están disponibles comercialmente o se pueden producir por diversos métodos conocidos en la técnica, tales como extracción con disolvente o extracción/destilación con vapor o se pueden sintetizar químicamente.

40 El tensioactivo puede ser no iónico, catiónico o aniónico. Ejemplos de tensioactivos incluyen polisorbato 20, polisorbato 80, polisorbato 40, polisorbato 60, éster de poliglicerilo, monooleato de poliglicerilo, monocaprilato de decaglicerilo, dicaprilato de propilenglicol, monoestearato de triglicerol, Tween™ 20, Span™ 20, Span™ 40, Span™ 60, Span™ 80, tensioactivos etoxilados de aceite de ricino o mezclas de los mismos.

45 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 98% a 80% en peso restante es ácido acético, ácido propiónico o una mezcla de los mismos. La composición puede contener de 0 a 20% en peso de terpenos, preferiblemente 0,5 - 10% y 0 a 20% en peso de tensioactivo, preferiblemente 0,5 - 5%. La composición total puede contener de 0 a 99% en peso de agua.

La presente invención es eficaz contra cualquiera de estas clasificaciones de agentes infecciosos presentes en el agua, los piensos y los principales ingredientes de los piensos, en particular, bacterias, micoplasmas, virus y hongos. Ejemplos de estos agentes infecciosos son *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 los métodos de la presente invención son eficaces en la prevención de muchas, si no todas, de estas infecciones en una gran diversidad de sujetos, incluyendo seres humanos, otros mamíferos y aves.

5 La presente invención incluye un método para desinfectar el agua, los piensos y los ingredientes para piensos. El método comprende administrar la composición por una diversidad de medios. Por ejemplo, pulverizada sobre piensos, pulverizada sobre el agua, mezclada en el agua potable, aplicada a las superficies en donde se almacenan agua y piensos para usos futuros o se consumen diariamente, añadida gota a gota a través de un medicador o desinfectante estándar de agua, p. ej., en recintos de cría, crecimiento y finalización para animales.

10 La composición de la presente invención se puede utilizar de forma segura y eficaz como un conservante del agua y piensos para todos los animales de engorde para fines comerciales, para el consumo humano y uso externo, para animales de compañía y otros animales en los que se desee una concentración microbiana baja en el pienso o suministro de agua.

**EJEMPLO 1 - Evaluación de ácidos Orgánicos Tamponados**

Propósito: Determinar el efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana de ácido acético y propiónico

15 Tratamientos:

- 1) Control (control negativo)
- 2) Ácido fórmico: Ácido propiónico (relación 90:10; control positivo)
- 3) Ácido acético (pH 1)
- 20 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)
- 9) Ácido acético (pH 7)
- 25 10) Ácido propiónico (pH 1)
- 11) Ácido propiónico (pH 2)
- 12) Ácido propiónico (pH 3)
- 13) Ácido propiónico (pH 4)
- 30 14) Ácido propiónico (pH 5)
- 15) Ácido propiónico (pH 6)
- 16) Ácido propiónico (pH 7)

Procedimiento:

35 Ácidos propiónico y acético se tamponaron con hidróxido de amonio a pH de 1 a 7. El contenido de ácido de las disoluciones tamponadas se determinó mediante un cálculo de la relación peso a peso para obtener el mismo contenido de ácido en las disoluciones de ensayo. Las disoluciones se añaden a agua desionizada estéril para proporcionar una disolución de ácido al 0,025%, 0,05%, 0,075% y 0,1%. Los pH de las disoluciones de agua desionizada se registraron y se señaló cualquier problema con la solubilidad.

40 100 ul de un cultivo de caldo de nutrientes de *Salmonella typhimurium* (ATTC 14028) se añadieron a cada uno de los tubos de dilución. Después de la adición, los tubos se agitaron con vórtice y se dejaron reposar. A las 4 y 24 horas después de la adición del inóculo, 100 ul de la disolución se sembraron en Placa de Agar estándar (placas por triplicado). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas antes de la enumeración. La dosis eficaz mínima de cada uno de los ácidos se determinó por regresión lineal.

Resultados:

Tabla 1. Efecto de Tamponamiento del pH sobre la Efectividad del Ácido Acético frente a Salmonella					
Producto de Ensayo	Conc. de producto.	Salmonella en el intervalo de tiempo			
		4 h		24 h	
		ufc/g	% reducción	ufc/g	% 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

ES 2 618 566 T3

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
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 Tamponamiento del pH sobre la Efectividad del Ácido Propiónico frente a Salmonella

Producto de Ensayo	Conc. de producto.	Salmonella en el intervalo de tiempo			
		4 h		24 h	
		ufc/g	% reducción	ufc/g	% 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
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
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. Concentración Inhibitoria Mínima

Tratamiento	MIC a las 4 H	MIC a las 24 H
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
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 – La MIC no puede determinarse debido a la falta de efecto en la tasa de dosis más alta.

10 Conclusiones: El tamponamiento de ácido acético o propiónico con amoníaco disminuyó la eficacia del producto frente a Salmonella. El punto de ruptura parece ser entre un pH de 3-4.

5

**EJEMPLO 2 - Evaluación de Ácidos Orgánicos Individuales**

Objetivo: Determinar el efecto de la longitud de la cadena de carbonos de los ácidos orgánicos sobre la actividad antimicrobiana

Tratamientos:

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

Procedimiento:

25 En este experimento, se evaluó el efecto de los ácidos grasos libres. Varios ácidos grasos de cadena larga (caprílico, pelargónico y láurico) no eran solubles en agua y KOH se utilizó para hacer que estos ácidos se disolvieran en agua (la disolución final contenía cantidades iguales en peso de ácido y KOH. El contenido de ácido de las disoluciones se determinó mediante un cálculo de la relación peso a peso (peso de ácido/ peso total de la disolución tamponada). Las disoluciones se añaden a agua desionizada estéril para proporcionar disoluciones de ácido al 0,025%, 0,05%, 0,075% y 0,1%. El pH de las disoluciones de agua desionizada se registró y se anotó cualquier problema con la solubilidad.

35 100 ul de un cultivo de caldo de nutrientes de Salmonella typhimurium (ATTC 14028) se añadieron a cada uno de los tubos de dilución. Después de la adición, los tubos se agitaron con vórtice y se dejaron reposar. A las 4 y 24 horas después de la adición del inóculo, 100 ul de la disolución se sembraron en agar (placas por triplicado). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas antes de la enumeración. La dosis eficaz mínima de cada uno de los ácidos se determinó por regresión lineal.

Tabla 4. Efecto de Ácidos Orgánicos frente a Salmonella					
Producto de Ensayo	Conc. de producto.	Salmonella en el intervalo de tiempo			
		4 h		24 h	
		ufc/g	% reducción	ufc/g	% reducción
Control		1600	0	1700	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

ES 2 618 566 T3

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
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

5

Tratamiento	MIC a las 4 H	MIC a las 24 H
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: No se observó que se produjera relación directa alguna entre la eficacia contra Salmonella y la longitud de la cadena de ácido orgánico. Esto contrasta con los efectos reseñados para la longitud de la cadena de ácido y la eficacia anti-hongos. La actividad de caprílico, pelargónico y láurico no se puede comparar con los ácidos de cadena más corta debido a la utilización de KOH.

#### 10 EJEMPLO 3- Mezclas de Ácidos Orgánicos Tamponados

Propósito: De los ácidos orgánicos de cadena larga, se observó que el pelargónico era el más eficaz en base a estudios anteriores. Este experimento es para determinar si hay un efecto sinérgico cuando ácido propiónico o acético tamponado se combina con ácido pelargónico.

##### Productos de Ensayo:

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

Procedimiento: Ácidos propiónico y acético se tamponaron con hidróxido de amonio a un pH de 3 y se combinaron con pelargónico en las relaciones anteriores. El contenido de ácido de las disoluciones tamponadas se determinó en un cálculo de la relación de peso a peso (peso de ácido/peso total de la disolución tamponada) y se ajustó para proporcionar un índice de acidez igual para cada uno de los tratamientos. Los tratamientos anteriores se añadieron a agua desionizada estéril para hacer disoluciones de ácido total al 0,025%, 0,05%, 0,075% y 0,1%. Los pH de las disoluciones de agua desionizada se registraron y se anotó cualquier problema con la solubilidad.

100 ul de un cultivo de caldo de nutrientes de Salmonella typhimurium (ATTC 14028) se añadieron a cada uno de los tubos de dilución. Después de la adición, los tubos se agitaron con vórtice y se dejaron reposar. A las 4 y 24 horas después de la adición del inóculo, 100 ul de la disolución se sembraron en Placa de Agar estándar (placas por triplicado). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas antes de la enumeración. La dosis eficaz mínima de cada uno de los ácidos se determinó por regresión lineal.

40

Tabla 6. Efecto del Ácido pelargónico sobre la eficacia de acético o propiónico frente a Salmonella					
Producto de Ensayo	Conc. de producto.	Salmonella en el intervalo de tiempo			
		4 h		24 h	
		ufc/g	% reducción	ufc/g	% 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
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 Inhibitoria Mínima de Pelargónico cuando se mezcla con ácido acético o propiónico		
Tratamiento	MIC a las 4 H	MIC a las 24 H
Ácido fórmico: Ácido propiónico	0,067	<0,025

Ácido propiónico	0,179	0,064
Ácido propiónico: ácido pelargónico (80:20)	<0,025	0,063
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

5

Conclusión: La adición de ácido pelargónico a ácido propiónico o acético resultó en un incremento en la eficacia.

#### ESTUDIO 4

10 Ácidos propiónico y acético se tamponaron con hidróxido de amonio a un pH de 3 y se combinaron con pelargónico en las relaciones enumeradas. El contenido de ácido de las disoluciones tamponadas se determinó en un cálculo de la relación de peso a peso (peso de ácido/peso total de la disolución tamponada) y se ajustó para proporcionar un índice de acidez igual para cada uno de los tratamientos. Los tratamientos anteriores se añadieron a agua desionizada estéril para hacer disoluciones de ácido total al 0,025% y 0,05%. Los pH de las disoluciones de agua desionizada se registraron y se anotó cualquier problema con la solubilidad.

15 100 ul de un cultivo de caldo de nutrientes de *Salmonella typhimurium* (ATTC 14028) se añadieron a cada uno de los tubos de dilución. Después de la adición, los tubos se agitaron con vórtice y se dejaron reposar. A las 4 y 24 horas después de la adición del inóculo, 100 ul de la disolución se sembraron en Placa de Agar estándar (placas por triplicado). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas antes de la enumeración.

Tabla 8. Efecto del Ácido pelargónico sobre la eficacia de acético o propiónico frente a *Salmonella*

Producto de Ensayo	Concentración de Producto	Salmonella en el intervalo de tiempo			
		4 h		24 h	
		(ufc/g)	% reducción	(ufc/g)	% 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
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	

- 5 Conclusión: La adición de ácido pelargónico (1-20%) a ácido propiónico o acético resultó en un aumento de la eficacia frente a Salmonella.

### ESTUDIO 5

- 10 Ácidos propiónico, acético y pelargónico por sí mismos o en combinación como se enumera, se añadieron a agua desionizada estéril para hacer disoluciones de ácido totales al 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02% y 0,01%. Los pH de las disoluciones en agua desionizada se registraron y se anotó cualquier problema con la solubilidad. 100 ul de un cultivo de caldo de nutrientes de Salmonella typhimurium (ATTC 14028) se añadieron a cada uno de los tubos de dilución. Después de la adición, los tubos se agitaron con vórtice y se dejaron reposar. A las 24 horas después de la adición del inóculo, 100 ul de la disolución se sembraron en Placa de Agar estándar (placas por triplicado). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas antes de la enumeración.

15

Prueba de Ensayo (%)	Salmonella 24 h 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
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
Control	1400				

UD = No se puede determinar

Conclusión: El ensayo demostró una eficacia incrementada mezclando Propiónico/Pelargónico (95/5) y Acético/Pelargónico (95/5) 24 horas después del tratamiento.

### ESTUDIO 6

- 20 Ácido cáprico (al 5%, 10% o 20%) diluido en ácido acético o ácido propiónico se ensayó para determinar su eficacia contra Salmonella en piensos.

- 25 Pienso avícola comercial modificado con Salmonella typhimurium (ATTC 14028) se trató con 1 o 3 kg/TM de las disoluciones enumeradas a continuación. Veinticuatro horas después del tratamiento, se añadieron 10 g de pienso a 90 ml de tampón Butterfield, se mezclaron y luego 100 ul de la disolución se sembraron en Placa de Agar estándar (placas por triplicado). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas antes de la enumeración.

Tratamiento	ufc/g	% Reducción
Control	5733	
Fórmico:Acético (1 kg/tonelada)	17	99,7
Ácido Acético (1 kg/tonelada)	3367	41,3
Ácido Acético (3 kg/tonelada)	2600	54,6
Cáprico al 5% en ácido acético (1 kg/tonelada)	3200	44,2
Cáprico al 5% en ácido acético (3 kg/tonelada)	3733	34,9
Cáprico al 10% en ácido acético (1 kg/tonelada)	3233	43,6
Cáprico al 10% en ácido acético (3 kg/tonelada)	2900	49,4
Cáprico al 20% en ácido acético (1 kg/tonelada)	3200	44,2
Cáprico al 20% en ácido acético (3 kg/tonelada)	4500	21,5

Tratamiento	ufc/g	% Reducción
-------------	-------	-------------

Control	4500	
Fórmico:Prop. 1 kg/tonelada	4100	8,9
Fórmico:Prop. 3 kg/tonelada	2067	54,1
Ácido Prop. 1 kg/tonelada	4633	0
Ácido Prop. 3 kg/tonelada	5633	0
Cáprico al 5% en ácido propiónico 1 kg/tonelada	3233	28,2
Cáprico al 5% en ácido propiónico 3 kg/tonelada	3400	24,4
Cáprico al 10% en ácido propiónico 1 kg/tonelada	2367	47,4
Cáprico al 10% en ácido propiónico 3 kg/tonelada	4033	10,4
Cáprico al 20% en ácido propiónico 1 kg/tonelada	4067	9,6
Cáprico al 20% en ácido propiónico 3 kg/tonelada	3700	17,8

- 5 No pareció que la adición de ácido cáprico a ácido acético o propiónico en concentraciones de 5 - 20% mejorara de manera significativa la eficacia del ácido orgánico frente a Salmonella en piensos.

### ESTUDIO 7

Se ensayó ácido mirístico (5%, 10% y 20%) diluido en ácido propiónico para determinar su eficacia frente a Salmonella en piensos. El ácido mirístico no era soluble en ácido acético.

- 10 Pienso avícola comercial modificado con Salmonella typhimurium (ATTC 14028) se trató con 1 o 3 kg/TM de las disoluciones enumeradas a continuación. Veinticuatro horas después del tratamiento, se añadieron 10 g de pienso a 90 ml de tampón Butterfield, se mezclaron y luego 100 ul de la disolución se sembraron en Placa de Agar estándar (placas por triplicado). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas antes de la enumeración.

Tabla 12. Efecto de los ácidos Mirístico/Propiónico frente a Salmonella en piensos.

Tratamiento	ufc/g	% 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
Mirístico al 5% en ácido propiónico 1 kg/TM	7767	80,58
Mirístico al 5% en ácido propiónico 3 kg/TM	1500	69,25
Mirístico al 10% en ácido propiónico 1 kg/TM	22567	43,58
Mirístico al 10% en ácido propiónico 3 kg/TM	23333	41,67
Mirístico al 20% en ácido propiónico 1 kg/TM	22667	43,33
Mirístico al 20% en ácido propiónico 3 kg/TM	22967	42,58

- 15 No se observó efecto beneficioso alguno en la eficacia cuando se añadió ácido mirístico a 5-20% a ácido propiónico en comparación con la combinación estándar de ácido propiónico.

### ESTUDIO 8

Ácido láurico (al 5%, 10%, 20%) diluido con ácido propiónico se ensayó para determinar su eficacia frente a Salmonella en piensos.

- 20 Pienso avícola comercial modificado con Salmonella typhimurium (ATTC 14028) se trató con 1 o 2 kg/TM de las disoluciones enumeradas a continuación. Veinticuatro horas después del tratamiento, se añadieron 10 g de pienso a 90 ml de tampón Butterfield, se mezclaron y luego 100 ul de la disolución se sembraron en Placa de Agar estándar (placas por triplicado). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas antes de la enumeración.

Tabla 13. Efecto de los ácidos Láurico/Propiónico frente a Salmonella en piensos.

Tratamiento	ufc/g	% 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
Láurico al 5% en ácido propiónico 1 kg/TM	8767	73,7
Láurico al 5% en ácido propiónico 3 kg/TM	433	98,7
Láurico al 10% en ácido propiónico 1 kg/TM	7800	76,6
Láurico al 10% en ácido propiónico 3 kg/TM	833	97,5
Láurico al 20% en ácido propiónico 1 kg/TM	9100	72,7
Láurico al 20% en ácido propiónico 3 kg/TM	2333	93,0

- 5 No se observó efecto beneficioso alguno cuando se añadió ácido láurico (5-20%) a ácido propiónico en comparación con la combinación estándar de ácido propiónico.

La siguiente sección de la descripción consiste en cláusulas numeradas que proporcionan simplemente declaraciones de la invención descrita en esta memoria. Las cláusulas numeradas en esta sección no son reivindicaciones. Las reivindicaciones se exponen a continuación en la sección posterior titulada "reivindicaciones".

- 10 1. Una composición antimicrobiana para prolongar la vida útil de agua, piensos o ingredientes para piensos, que comprende:  
 1% a 99% en peso de ácidos orgánicos en disolución acuosa, que es una mezcla C<sub>2</sub>:C<sub>9</sub> o C<sub>3</sub>:C<sub>9</sub> de ácidos orgánicos, tamponado a pH = 1-5;  
 0 a 20% en peso de terpenos, y  
 0,5 - 10% de tensioactivos;
- 15 en donde la concentración de ácido C<sub>9</sub> es de 2 a 20% en peso, basado en el contenido total de ácidos orgánicos.
2. La composición antimicrobiana de la cláusula 1, que está tamponada a pH = 1-3.
- 20 3. La composición antimicrobiana de la cláusula 1, en donde el tensioactivo es polisorbato 20, polisorbato 80, polisorbato 40, polisorbato 60, éster de poliglicerilo, monooleato de poliglicerilo, monocaprilato de decaglicerilo, dicaprilato de propilenglicol, monoestearato de triglicerol, Tween™ 20, Span™ 20, Span™ 40, Span™ 60, Span™ 80, tensioactivos de aceite de ricino etoxilado o mezclas de los mismos.
- 25 4. La composición antimicrobiana de la cláusula 1, en donde la concentración de tensioactivo es de 0,5 a 5% en peso.
5. La composición antimicrobiana de la cláusula 1, en donde el terpeno se selecciona 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.
- 30 6. La composición antimicrobiana de la cláusula 1, en donde el terpeno se selecciona del grupo que consiste en disulfuro de alilo, timol, citral, eugenol, carvacrol, y carvona, o mezclas de los mismos.
7. La composición antimicrobiana de la cláusula 1, en donde el contenido de terpeno es 0,5 - 10% en peso.
- 35 8. Un método para prolongar la vida útil de agua, piensos o ingredientes para piensos, que comprende: tratar por pulverización o mezclar al agua, piensos o ingredientes para piensos, una cantidad efectiva de una composición que comprende 1% a 99% en peso de ácidos orgánicos en disolución acuosa, que es una mezcla C<sub>2</sub>:C<sub>9</sub> o C<sub>3</sub>:C<sub>9</sub> de ácidos orgánicos tamponados a un pH = 1-5;  
 0 a 20% en peso de terpenos, y  
 0,5 - 10% de tensioactivos;
- 40 en el que la concentración de ácido C<sub>9</sub> es de 2 a 20% en peso, basado en el contenido de ácido orgánico total.
9. El método de la cláusula 8, en el que la composición está tamponada a pH = 1-3.
- 45 10. El método de la cláusula 8, en el que el tensioactivo es polisorbato 20, polisorbato 80, polisorbato 40, polisorbato 60, éster de poliglicerol, monooleato de poliglicerilo, monocaprilato de decaglicerilo, dicaprilato de propilenglicol, monoestearato de triglicerol, Tween™ 20, Span™ 20, Span™ 40, Span™ 60, Span™ 80, tensioactivos de aceite de ricino etoxilados o mezclas de los mismos.
11. El método de la cláusula 8, en el que la concentración de tensioactivo es de 0,5 a 5% en peso.
- 50 12. El método de la cláusula 8, en el que el terpeno se selecciona 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.
13. El método de la cláusula 8, en el que el terpeno se selecciona del grupo que consiste en disulfuro de alilo, timol, citral, eugenol, carvacrol y carvona, o mezclas de los mismos.
14. El método de la cláusula 8, en el que el contenido de terpeno es 0,5 a 10% en peso.

- 5            15.    El método de la cláusula 8, en el que la composición es eficaz contra bacterias, virus, micoplasmas u hongos presentes en el agua potable, piensos e ingredientes para piensos.

5

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición antimicrobiana para prolongar la vida útil de agua, piensos o ingredientes para piensos, comprendiendo la composición antimicrobiana una disolución acuosa de ácidos orgánicos, que comprende:  
una disolución acuosa de ácidos de cadena corta tamponada a un pH entre pH 1 y 5; en donde el ácido de  
cadena corta es ácido acético, ácido propiónico o una mezcla de los mismos a una concentración de 80 a 98% en  
10 peso del contenido total de ácidos orgánicos en la disolución acuosa de ácidos orgánicos; y  
ácido pelargónico a una concentración en un intervalo de 2 a 20% en peso del contenido total de ácidos  
orgánicos en la disolución acuosa de ácidos orgánicos.
2. La composición antimicrobiana de la reivindicación 1, en donde la disolución acuosa de ácidos de cadena corta  
tamponada está tamponada a un pH entre 1 y 3.
- 15 3. La composición antimicrobiana de la reivindicación 1, que comprende, además, un tensioactivo, en donde el  
tensioactivo es polisorbato 20, polisorbato 80, polisorbato 40, polisorbato 60, éster de poliglicerilo, monooleato de  
poliglicerilo, monocaprilato de decaglicerilo, dicaprilato de propilenglicol, monoestearato de triglicerol, tensioactivo de  
aceite de ricino etoxilado o mezclas de los mismos.
- 20 4. La composición antimicrobiana de la reivindicación 3, en donde el tensioactivo está a una la concentración de 0,5  
a 5% en peso de la composición antimicrobiana.
5. La composición antimicrobiana de la reivindicación 1, que comprende, además, un terpeno, en donde el terpeno  
es disulfuro de alilo, citral, pineno, nerol, geraniol, carvacrol, eugenol, carvona, anetol, alcanfor, mentol, limoneno,  
farnesol, caroteno, timol, borneol, mirceno, terpeneno, linalool o una mezcla de los mismos.
- 25 6. La composición antimicrobiana de la reivindicación 5, en donde el terpeno está en una concentración de 0,5 - 10%  
en peso de la composición antimicrobiana.
7. Un método para desinfectar agua, piensos o ingredientes para piensos, comprendiendo el método administrar la  
composición antimicrobiana de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 al agua, piensos o ingredientes para  
piensos.
- 30 8. El método de la reivindicación 7, en el que la composición antimicrobiana se pulveriza sobre los piensos, agua o  
se mezcla en el agua potable.
9. El método de la reivindicación 7, en el que la composición antimicrobiana se aplica a una superficie en la que el  
agua y los piensos se almacenan para un uso futuro o diario.
10. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 como un conservante para  
piensos para un animal de engorde para fines comerciales o animal de compañía.