

401328

P.-50.433

File:Grace 254

26



MEMORIA DESCRIPTIVA

Int. Cl. ² : A 01 N

para solicitar PATENTE DE INVENCION por VEINTE años

a nombre de W. R. GRACE & CO.

entidad norteamericana

con domicilio en 3 Hanover Square, Nueva York, N.Y.

Estados Unidos de América

por: "UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UNA COMPOSICION QUE COMPRENDE UN SUBSTRATO CAPAZ DE SER INFECTADO POR PATOGENOS DE PLANTA Y ANIMAL". (Clase Internacional A01m).

401328

29



Como es ya bien sabido en la industria agrícola, los patógenos de las plantas y los animales, a los cuales se hará referencia a continuación como microorganismos, son un problema serio y la causa de graves consecuencias económicas. Para los objetos de esta especificación y de las cláusulas, los patógenos de las plantas y de los animales incluyen mohos, levaduras y bacterias tales como las especies de Sclerotium rolfsii, Rhizoctonia solani, Fusarium, Pythium, Penicillium, Aspergillus, que son la causa principal de la descomposición de las sustancias alimenticias para los animales (que incluyen alimentos mezclados, ensilaje, granos fermentados y plantas), las especies Candida albicans, Salmonella, y Escherichia coli.

Como es también sabido, las micotoxinas, es decir, los venenos producidos mediante mohos y hongos que permanecen en una sustancia alimenticia, son perjudiciales al animal que digiere la sustancia alimenticia, y puede ocasionar desórdenes semejantes, a aquellos producidos por los patógenos anteriormente citados. Las micotoxinas se producen tanto mediante organismos patogénicos, como organismos que por sí no son patogénicos. Deberá quedar comprendido, por lo tanto que "patógeno" se refiere asimismo a los microorganismos que producen la micotoxina, para los objetos de esta especificación y de las cláusulas.

Los intentos para controlar el crecimiento del moho, han incluido el uso de azufre, compuestos de cobre, compuestos de mercurio, varios carbonatos, glio-xalidina, quinón, captán, guanidina y más recientemente,

401328

29 MAR 1972



los ácidos propiónicos y sus sales. De estos, la sal de calcio $\text{Ca}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2)_2$ del ácido propiónico, ha sido la más extensamente usada.

5 Cierta enfermedad de las plantas conocida como "tizón de los retoños" se ocasiona mediante patógenos que son llevados en la semilla y que atacan los retoños a través de su crecimiento. La podredumbre de la semilla ocurre debido a los patógenos que están presentes en la tierra que rodea la semilla y que son lo bastante poderosos como para destruir la semilla, aún antes de que comience a germinar. Si las semillas germinan y crecen hasta 10 llegar a la madurez, todavía hay el problema serio del crecimiento adicional del moho durante el almacenamiento de las sustancias alimenticias. Los inhibidores de moho 15 usados anteriormente, han tenido éxito parcial, pero todavía hay una pérdida seria de sustancias alimenticias debido a un crecimiento de los mohos.

 Es también sabido en la industria agrícola, que varios animales padecen de malfuncionamiento de las 20 vías digestivas con diarrea resultante. Esto desde luego, conduce a aumento de peso insatisfactorio y frecuentemente aún a la muerte del animal. Un término general aplicado a esta condición es el de "diarrea blanca". No se ha determinado cuál de los patógenos es el responsable de ocasionar esta condición, aún cuando el Escherichia coli 25 generalmente está presente cuando aparece esta condición. Están asimismo presentes, otros patógenos, tales como las especies de Candida albicans y Salmonella, particularmente en condiciones de diarrea en las aves de corral. Es también 30 sabido que, en muchos animales, la diarrea es un síntoma



frecuente de infección de Candida albicans. Hasta ahora, aún cuando ha sido evidente que los efectos de ciertas infecciones del organismo patogénico obstaculizaban el crecimiento de los animales, ha habido poco éxito en los intentos de resolver el problema.

5 Como es evidente, los organismos patogénicos que ocasionan el crecimiento del moho en las semillas y las sustancias alimenticias para animales, que afectan perjudicialmente el aumento de peso de los animales, son de consecuencias económicas serias a la industria agrícola.

10 Consecuentemente, un objeto de esta invención es proporcionar la manera de inhibir el crecimiento y proliferación de los microorganismos de las plantas y de los animales. Más específicamente, un objeto de esta invención es inhibir el crecimiento del moho en semillas y sustancias alimenticias para animales, particularmente las especies de Sclerotium rolfsii, Rhizoctonia solani, Fusarium, Pythium, Penicillium, Aspergillus, Candida albicans, Salmonella, las especies de Escherichia coli, y reducir cualquier efecto que las micotoxinas puedan tener en los animales.

25 Se ha encontrado que el ácido isobutírico y sus sales en cantidades relativamente pequeñas, inhibe el crecimiento de los patógenos anteriormente citados. Se ha encontrado que, cuando se agregan cantidades pequeñas del ácido isobutírico o sus sales, a una ración del alimento del animal como un aditivo, el animal muestra un régimen significativo de aumento de peso, superior a aquel de los animales que no reciben aditivo. Como es bien sabido

401328



do en el ramo, a fin de que crezca el moho, es necesario
que el substrato contenga por lo menos el 12 por ciento
de humedad. Se ha encontrado que cuando se aplica a dichas
substancias un isobutirato, v.gr., isobutirato de amonio,
5 se inhibe el crecimiento de los mohos. De hecho, estos
isobutiratos son eficaces en substratos de contenido de
humedad aún mayor, v.gr., de 30 por ciento y más.

Tal y como el término se utiliza en la presen-
te, "isobutirato" se refiere al ácido isobutírico y sus
10 sales. El ácido isobutírico es capaz de funcionar en esta
invención. De hecho, cuando sus sales se usan, aparentemen-
te se hidrolizan en ácido butírico y en la base respectiva,
de manera que el componente eficaz, puede todavía ser el
ácido isobutírico y/o el ión de isobutirato. Las sales del
15 ácido isobutírico por lo general se prefieren al ácido per
se, debido a que tienen menos olor y se almacenan, embar-
can y manejan más fácilmente. Aún cuando los isobutiratos
en general son eficaces, se prefieren las sales de los
Grupos I y II de la Tabla Periódica, particularmente Na
20 y K, así como la sal de amonio.

La cantidad de isobutirato que se requiere
para inhibir el crecimiento del moho variará hasta cierto
grado dependiendo de la naturaleza del substrato. Por lo
general, se requiere por lo menos 0,25 por ciento en peso
25 de isobutirato, basado en el peso del substrato más el
isobutirato. Se logra una inhibición de moho eficaz a ni-
veles de 1 a 2 por ciento. Las cantidades mayores del 2
por ciento, aún cuando son útiles y capaces de funcionar,
por lo general no proporcionan resultados superiores a
30 los niveles de 1 o de 2 por ciento y por lo tanto no se

401328



5 prefieren. Una escala generalmente preferida es de 0,5 a 1 por ciento.

5 Se ha encontrado además que una combinación de un isobutirato, v.gr., isobutirato de amonio y un segundo componente puede ser el ácido acético o cítrico o el sulfato de laurilo de sodio, proporciona un efecto sinérgico cuando se usa para controlar el crecimiento del moho. Tal y como se demostrará en los siguientes ejemplos, ni un nivel de isobutirato de amonio de 0,5 por ciento
10 (basado en el peso del substrato más el isobutirato) ni un nivel de un aditivo de ácido cítrico de 0,4 por ciento (basado en el peso de substrato más el aditivo) fue eficaz para controlar el crecimiento de mohos en semillas y sustancias alimenticias. Sin embargo, una combinación de
15 0,5 por ciento de isobutirato de amonio y 0,1 por ciento de ácido cítrico o de ácido acético, fue eficaz para controlar el crecimiento del moho. Por lo general, el aditivo constituye por lo menos del 0,1 al 0,4 por ciento en peso, de preferencia de 0,2 a 0,4 por ciento en peso del
20 peso total del inhibidor de crecimiento de moho más el substrato.

Más específicamente, cuando se usan las combinaciones anteriormente mencionadas, se prefiere utilizar una relación de ácido cítrico o acético:isobutirato de
25 amonio, dentro de la escala de 0,133-0,2:1 ó de sulfato de laurilo de sodio:isobutirato de amonio de 0,1-0,4:1. Aún cuando se prefieren las relaciones anteriormente citadas, puede utilizarse hasta 1,67 partes del ácido o del sulfato por una parte del isobutirato de amonio.

30 La combinación anteriormente descrita se añade

401328

29 MAR



al sitio que se desea proteger ya sea mediante espolvoreamiento, aplicación de una suspensión acuosa o rociadura sobre las substancias alimenticias en una relación del inhibidor de moho a la substancia alimenticia de 0,0045-
5 0,20:1, de preferencia de 0,006-0,012:1.

Se ha encontrado que, además de su efecto en los patógenos de las plantas, los isobutiratos son eficaces contra los patógenos de los animales. Esto es particularmente sorprendente en vista del hecho de que generalmente se ha creído que el ácido butírico era ineficaz contra los patógenos de los animales, particularmente el Candida albicans (Patente Norteamericana Número 2.841.526).

Sin embargo, se ha encontrado que cuando un medio de caldo nutritivo que consiste de por lo menos 0,4
15 por ciento de un isobutirato (v.gr., isobutirato de amonio, calcio, sodio, magnesio y potasio) se inocula con un patógeno de animales (v.gr., especie de Salmonella y Escherichia coli), el crecimiento de los patógenos se inhibe eficazmente. Se ha encontrado además que el efecto sinérgico que se obtiene cuando la combinación de un isobutirato y un aditivo ya sea de ácido acético o ácido cítrico o de sulfato de laurilo de sodio se aplica contra los patógenos de las plantas, puede también aplicarse a los patógenos de los animales anteriormente enumerados.
20 Aún cuando se prefiere que el ácido acético, el ácido cítrico o el sulfato de laurilo de sodio constituyen el 0,2 al 0,4 por ciento en peso de la substancia alimenticia más el isobutirato más el aditivo, y que el isobutirato constituya del 0,25 al 2,0 por ciento en peso de la substancia alimenticia, más el isobutirato más el aditivo, los
25
30

401328

20



porcentajes efectivos son de 0,1 a 0,4 por ciento en peso del aditivo y de 0,25 a 4,0 por ciento en peso del isobutirato.

5 Cuando se administra a los animales el inhibidor de crecimiento de patógenos, se ha encontrado que son satisfactorios varios métodos de introducción en el animal. En un método conveniente, el inhibidor del crecimiento del patógeno se introduce en el animal como un suplemento del alimento, rociando el inhibidor de crecimiento
10 to de patógeno, en substancia alimenticia, a fin de que de 0,25 a 2,0 por ciento de la dieta diaria de animal, consista del inhibidor de crecimiento de patógenos. Desde luego, el porcentaje del inhibidor de crecimiento de patógenos en el alimento diario, variará con el animal específico.
15 Por ejemplo, es eficaz para los pollos, una cantidad de 0,5 a 1 por ciento de la dieta diaria. Se ha encontrado asimismo, que para lechones, es muy conveniente una aplicación de una botella con una disposición de "émbolo de empuje" en donde se administra oralmente, una cantidad
20 específica del inhibidor de crecimiento de patógenos. Es conveniente preparar una solución en agua del inhibidor de crecimiento de patógenos que contenga de 4 a 8 por ciento en peso del inhibidor del crecimiento de patógenos basándose en el peso total del inhibidor del crecimiento
25 de patógenos más el solvente.

30 Cuando una sal del ácido isobutírico particularmente la sal de amonio se suministra como un aditivo para alimentos de aves de corral, hay un aumento significativo en el régimen de aumento de peso demostrado por el animal. Aún cuando se prefiere que del 0,4 a 0,6 por cien-

401328

29M



to en peso de la dieta total, sea una sal del ácido isobutírico, una cantidad de 0,25 a 2,00 por ciento en peso de la dieta total, produce un régimen acrecentado de aumento en peso.

5 Por lo general, una substancia alimenticia tratada para el control de moho, todavía contiene isobutirato cuando se alimenta a los animales; dicho isobutirato ayudará a controlar los patógenos en la vía digestiva de los animales, tal y como se demuestra en los distintos
10 ejemplos que se dan a continuación.

Los siguientes ejemplos ayudarán a explicar la presente invención, pero se destinan a ser ilustrativos únicamente y no deben interpretarse en un sentido de limitación.

15

Ejemplo 1

Un medio de agar que contiene 0,25 por ciento en peso de isobutirato de amonio se vació en un platillo
20 de petri. Se introdujo en el platillo de petri un patógeno de plantas bien conocido, el Sclerotium rolfsii. Después de un período de dos semanas, se encontró que no había ocurrido un crecimiento del moho. Al mismo tiempo, el Sclerotium rolfsii, que se aplicó al medio de agar en
25 un platillo de Petri, sin incluir la sal de amonio, mostró un crecimiento de moho considerable.

Ejemplo 2

30 Se repitió el Ejemplo 1 con la excepción de que el patógeno de la planta era Rhizoctonia solani. Se

401328



obtuvieron resultados idénticos al Ejemplo 1.

Ejemplos 3 a 5

5 Se preparó un medio de agar que contenía 1,5
por ciento en peso de isobutirato de amonio y se vació
en siete platillos de Petri. En cada uno de los primeros
cinco platillos, se introdujo una especie de cinco espe-
cies no identificadas de Fusarium; en el sexto se intro-
10 dujo, Fusarium oxysporium, y en el séptimo platillo se in-
trodujo la especie Pythium. En cada caso, después de un
período de dos semanas, no había evidencia de crecimiento
de moho. Cuando los mismos patógenos se aplicaron a un
medio de agar que no contenía el isobutirato de amonio,
15 hubo crecimiento de moho considerable.

Ejemplo 6

20 Se expusieron a isobutirato de amonio, va-
rios substratos con un contenido de humedad de 30 por
ciento. Se encontró que cuando las alícuotas de 70 gra-
mos de maíz molido, maíz triturado, maíz entero y mijo
triturado, se trataron con 30 mililitros de agua que
contenían de 0,5 a 1,5 gramos de isobutirato de amonio,
25 se inhibió eficazmente el crecimiento del moho. Cuando
un substrato semejante se roció con una cantidad igual
de propionato de calcio, el moho continuó creciendo. Fue
necesaria una cantidad de 2,0 por ciento en peso de pro-
pionato de calcio, para inhibir eficazmente el crecimien-
30 to del moho. Se encontró también, que una cantidad de

401328



aproximadamente 1,0 por ciento en peso de isobutirato de amonio, era eficaz para controlar el crecimiento del moho en harina de cacahuete; mientras que se necesitó por lo menos 2,0 por ciento en peso de propionato de calcio para inhibir el mismo crecimiento. Además, de 0,5 a 1,25 por ciento en peso de isobutirato de amonio fue eficaz para controlar el crecimiento del moho en harina de semilla de algodón y trigo; sin embargo, se necesitó por lo menos 2,0 por ciento en peso de propionato de calcio para lograr la misma cantidad de control. Los resultados se resumen en el Cuadro que se da a continuación:

CUADRO I

Substrato (30% de humedad)	<u>Nivel eficaz típico</u>	<u>Nivel eficaz típico</u>
	Isobutirato de NH ₄	Propionato de calcio
Maíz molido	0,75-1,5%	2,0%
Maíz triturado	0,75-1,5%	2,0%
Maíz entero	0,75-1,5%	2,0%
Mijo triturado	0,75-1,5%	2,0%
Harina de cacahuete	1,00%	2,0%
Harina de semilla de algodón	0,5-1,25%	2,0%
Trigo	0,5-1,25%	2,0%

Ejemplo 7

Se preparó una solución acuosa al 0,5 por ciento en peso de isobutirato de níquel. Se colocaron aproximadamente 1000 mililitros en un vaso picudo y unas semi-



llas de maíz se sumergieron en la solución y se dejaron permanecer en la misma durante 15 segundos. Las semillas se colocaron luego en un recipiente seco. Otro juego de semillas se colocó también en un recipiente semejante, y después de un período de dos semanas, era evidente el crecimiento considerable del moho. Sin embargo, no hubo indicación de crecimiento de moho en las semillas que se habían sumergido en el isobutirato de níquel.

10

Ejemplo 8

El substrato era 70 gramos de maíz secado. A este se aplicó una cantidad de 1,5 gramos de isobutirato de potasio disueltos en 30 mililitros de agua. Se inhibió eficazmente el crecimiento del moho. Cuando una muestra semejante de maíz molido no se roció con el isobutirato de potasio, hubo abundancia de crecimiento de moho después de un período de dos semanas.

20

Ejemplo 9

Se trataron 3630 kilogramos de grano de sorgo (Sorghum vulgare) con 0,75 por ciento en peso de isobutirato de amonio como un polvo seco (27,25 kilogramos), a fin de proporcionar una mezcla homogénea y se almacenó como un ensilaje bajo condiciones herméticas al aire, durante un período de un mes, al final de cuyo período se inspeccionó para determinar si había presente moho y no se encontró ninguno. Una muestra semejante, se almacenó también como un ensilaje durante un mes pero no se trató

401328



con isobutirato de amonio. Después de este período exhibió crecimiento considerable de moho.

Ejemplo 10

5

Varios substratos con contenidos de humedad de 30 a 40 por ciento, se expusieron a isobutirato de amonio y ácido cítrico. Se encontró que cuando las alícuotas de 70 gramos de maíz molido, maíz triturado, maíz entero, mijo triturado, harina de cacahuete, harina de semilla de algodón y trigo, se trataron con 30 mililitros de agua que contenían por lo menos 0,5 gramos de isobutirato de amonio y 0,1 gramo de ácido cítrico, se inhibió eficazmente el crecimiento del moho. Los resultados completos se proporcionan en el Cuadro II para el maíz triturado. Se obtuvieron resultados semejantes con maíz molido, maíz entero, mijo triturado, harina de cacahuete, harina de semilla de algodón y trigo.

10

15

401328

29



CUADRO II

Isobutirato de Amonio y Acido Cítrico como Inhibidor de
Crecimiento de Moho

% de Iso- butirato de NH ₄	Acido Cítrico	Crecimiento de moho en maíz tritura- do con contenido de humedad de 30-40: %			
		4o día	8o día	11o día	15o día
Ninguno	Ninguno	+	+	+	+
ninguno	0,1	+	+	+	+
ninguno	0,2	+	+	+	+
ninguno	0,4	+	+	+	+
0,25	ninguno	vestigio	+	+	+
0,25	0,1	vestigio	+	+	+
0,25	0,2	-	vestigio	+	+
0,25	0,4	-	-	vestigio	+
0,5	ninguno	-	-	vestigio	+
0,5	0,1	-	-	-	-
0,5	0,2	-	-	-	-
0,5	0,4	-	-	-	-
0,75	ninguno	-	-	-	+
0,75	0,1	-	-	-	-
0,75	0,2	-	-	-	-
0,75	0,4	-	-	-	-

Nota: "+" significa presencia considerable de moho;
"- " significa ningún moho detectable.

Ejemplos 11 y 12

Se repitió el Ejemplo 10 substituyendo el
isobutirato de níquel por isobutirato de amonio en el
Ejemplo 11 e isobutirato de potasio por el isobutirato de

401328 29



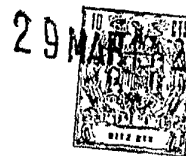
amonio en el Ejemplo 12. Se obtuvieron resultados semejantes a aquellos del Ejemplo 10.

Ejemplo 13

5

Varios substratos con un contenido de humedad de 30 por ciento se expusieron a isobutirato de amonio y sulfato de laurilo de sodio. Se encontró que cuando las alícuotas de 70 gramos de maíz molido, maíz triturado, 10 maíz entero, mijo triturado, harina de cacahuete, harina de semilla de algodón y trigo se trataron con 30 mililitros de agua, que contenían por lo menos 0,5 gramos de isobutirato de amonio y 0,4 gramos de amonio y 0,4 de sulfato de laurilo de sodio, se inhibió eficazmente el crecimiento 15 del moho. Los resultados completos se proporcionan en el Cuadro III para las muestras de maíz triturado. Se lograron resultados semejantes con maíz molido, maíz entero, mijo triturado, harina de cacahuete, harina de semilla de algodón y trigo.

401328

CUADRO III

Isobutirato de Amonio y Sulfato de Laurilo de Sodio como
un Inhibidor de Crecimiento de Moho

% de Iso- butirato de NH ₄	% de Sulfa- to de lau- rilo de Na	Crecimiento de moho en maíz tritu- rado con un contenido de humedad de 30 a 40 por ciento			
		4o. día	8o. día	11o.día	15o.día
Ninguno	ninguno	+	+	+	+
ninguno	0,1	+	+	+	+
ninguno	0,2	+	+	+	+
ninguno	0,4	+	+	+	+
0,5	ninguno	-	vestigio	+	+
0,5	0,1	+	+	+	+
0,5	0,2	-	-	vestigio	+
0,5	0,4	-	-	-	-
1,0	ninguno	-	-	-	-
1,0	0,1	-	-	-	-
1,0	0,2	-	-	-	-
1,0	0,4	-	-	-	-

Nota: "+", significa presencia considerable de moho;
"-", significa ningún moho detectable.

Ejemplos 14 a 15

Los Ejemplos 14 y 15 siguieron el procedi-
miento del Ejemplo 13, pero las sales de níquel y potasio
del ácido isobutírico se substituyeron respectivamente por
el isobutirato de amonio, con resultados favorables seme-
jantes.

401328²⁹



Ejemplo 16

5 Un medio de agar que contenía 0,25 por ciento en peso de isobutirato de amonio y 0,2 por ciento en peso de ácido cítrico se vació en un platillo de petri. Se introdujo Sclerotium rolfsii en el platillo de petri. Después de un período de dos semanas, se encontró que no había ocurrido crecimiento de moho. Al mismo tiempo, el Sclerotium rolfsii que se aplicó a un medio de agar en un platillo de petri sin isobutirato de amonio y ácido cítrico,
10 mostró crecimiento considerable de moho.

Ejemplo 17

15 Se repitió el Ejemplo 16, con la excepción de que el patógeno de la planta era Rhizoctonia solani. Se obtuvieron resultados idénticos al Ejemplo 16.

Ejemplo 18

20 Un medio de agar que contenía 0,5 por ciento en peso de isobutirato de amonio y 0,2 por ciento en peso de sulfato de laurilo de sodio se vació en un platillo de petri. Se introdujo Sclerotium rolfsii en el platillo de petri. Después de un período de dos semanas, se encontró
25 que no había ocurrido el crecimiento del moho. Al mismo tiempo, el Sclerotium rolfsii que se aplicó a un medio de agar en un platillo de Petri sin el isobutirato de amonio y el sulfato de laurilo de sodio, mostró crecimiento considerable de moho.
30



Ejemplo 19

5 Se repitió el Ejemplo 18 con la excepción de que el patógeno de la planta era Rhizoctonia solani. Se obtuvieron resultados idénticos al Ejemplo 16.

Ejemplos 20 a 22

10 Se repitió el Ejemplo 16 substituyendo cinco especies no identificadas de Fusarium (Ejemplo 20), Fusarium oxysporium (Ejemplo 21), y Pythium (Ejemplo 22). En cada ejemplo, no hubo evidencia de crecimiento de moho después de un período de dos semanas.

15 Ejemplos 23 a 25

20 Se repitió el Ejemplo 18 substituyendo cinco especies no identificadas de Fusarium (Ejemplo 23), Fusarium oxysporium (Ejemplo 24) y una especie de Pythium (Ejemplo 25). En cada caso no hubo evidencia de crecimiento de moho después de un período de dos semanas.

Ejemplo 26

25 3.630 kilogramos de grano de sorgo (Sorghum vulgare) se trataron con 0,25 por ciento en peso de isobutirato de amonio (9,1 kilogramos) y 0,20 por ciento en peso de ácido cítrico (7,25 kilogramos) como una composición seca para proporcionar una mezcla homogénea y se almacenaron como ensilaje bajo condiciones herméticas al aire

30

401328



29 MAR 1972

5 durante un período de un mes. Se trató una muestra semejante con 0,50 por ciento en peso de isobutirato de amonio (18,2 kilogramos) y 0,20 por ciento en peso de sulfato de laurilo de sodio (7,25 kilogramos) como una composición
seca para proporcionar una mezcla homogénea y la misma se almacenó también como un ensilaje bajo condiciones herméticas al aire durante un período de un mes. Al final del un mes las mezclas se inspeccionaron para determinar si había moho y no se encontró ninguno.

10

Ejemplo 27

15 Un medio de agar que contenía 4,0 por ciento en peso de isobutirato de amonio se vació en un platillo de petri. Se introdujo en el platillo de petri el Escherichia coli, un patógeno bien conocido que se aisló de un cerdo con "diarrea blanca". Después de un período de dos semanas, se encontró que no había ocurrido el crecimiento del patógeno. Al mismo tiempo, el Escherichia coli que se
20 aplicó a un medio de agar en un platillo de petri sin la sal de amonio mostró un crecimiento considerable del moho.

Ejemplo 28

25 Se repitió el Ejemplo 27 con la excepción de que se substituyó isobutirato de potasio por el isobutirato de amonio. Se obtuvieron resultados semejantes.

401328 29



Ejemplos 29 a 31

Se repitió el Ejemplo 27 con la excepción
de que tres especies de Salmonella, S. Typhimurium,
5 S. gallinarum y S. pullorum, se substituyeron por el
Escherichia coli de los Ejemplos 29, 30 y 31, respecti-
vamente. Ninguno de los platillos de petri mostraron
señales del crecimiento patogénico aún cuando las mues-
tras de control preparadas de la misma manera, contenían
10 una cantidad considerable del crecimiento patogénico.

Ejemplo 32

Unos medios de caldo nutritivo que contenían
15 varios porcentajes en peso de isobutirato de amonio y
ácido acético, tal como se demuestra en el Cuadro IV,
se inocularon con tres especies de Salmonella, S. typhi-
murium, S. gallinarum y S. pullorum. Como se muestra en
el Cuadro IV en cada caso se inhibió el crecimiento de
20 Salmonella cuando había presente en el medio de agar 2,0
por ciento en peso de isobutirato de amonio y 0,1 por
ciento en peso de ácido cítrico.

401328

29 MAR




CUADRO IV

Efectos del isobutirato de amonio ("AIB") y ácido cítrico
en la especie Salmonella

% de AIB	(Typhimurium Salmonella) % de ácido cítrico						
	0	0,0125	0,025	0,05	0,1	0,2	0,4
0	+	+	+	+	+	+	-
0,125	+	+	+	+	+	+	-
0,25	+	+	+	+	+	-	-
0,5	+	+	+	+	+	-	-
1,0	+	+	+	+	+	-	-
2,0	+	+	+	+	-	-	-
4,0	-	-	-	-	-	-	-

% AIB	(Salmonella gallinarum) % de ácido cítrico						
	0	0,125	0,025	0,05	0,1	0,2	0,4
0	+	+	+	+	+	+	-
0,125	+	+	+	+	+	+	-
0,25	+	+	+	+	+	-	-
0,5	+	+	+	+	+	-	-
1,0	+	+	+	+	+	-	-
2,0	+	+	+	+	-	-	-
4,0	-	-	-	-	-	-	-

401328 29 MAR 1972



% ATB

(Salmonella pullorum)
% de ácido cítrico

	0	0,125	0,025	0,05	0,1	0,2	0,4
0	+	+	+	+	+	+	-
5	0,125	+	+	+	+	+	-
	0,025	+	+	+	+	-	-
	0,5	+	+	+	+	-	-
	1,0	+	+	+	+	-	-
	2,0	+	+	+	-	-	-
10	4,0	-	-	-	-	-	-

Nota: + significa crecimiento de patógenos; "-" significa que no hubo crecimiento.

15

Ejemplo 33

20

Los medios de caldo nutritivo que contenían varios porcentajes en peso de isobutirato de amonio y ácido cítrico, como se muestra en el Cuadro V, se inocularon con Candida albicans. Como se muestra en el Cuadro V, el crecimiento de Candida albicans se inhibió cuando habían presentes juntos (pero no separadamente) en el medio, 0,5 por ciento en peso de isobutirato de amonio y 0,2 por ciento de ácido cítrico.

401328

29



CUADRO V

Efectos inhibitorios de las Combinaciones de Acido Cítrico e Isobutirato de NH_4 en C. albicans³²

5	Isobutirato de NH_4 (%)	Acido cítrico (%)						
		0,0	0,0125	0,025	0,05	0,1	0,2	0,4
	0,0	+	+	+	+	+	+	+
	0,125	+	+	+	+	+	+	-
	0,25	+	+	+	+	+	-	-
10	0,5	+	+	+	+	+	-	-
	1,0	+	+	+	+	-	-	-
	2,0	+	+	+	+	-	-	-
	4,0	+	+	+	+	-	-	-

15 ³² La hilera horizontal superior representa la susceptibilidad al ácido cítrico solo. La columna vertical izquierda representa la susceptibilidad al isobutirato de NH_4 solo. La concentración inhibitoria de la mezcla: 0,2 por ciento de ácido cítrico, 0,25 por ciento de isobutirato de NH_4 .

20 El símbolo: + = crecimiento en tubo; - = ningún crecimiento visible.

Ejemplo 34

25 Unos medios de caldo nutritivo que contenían varios porcentajes en peso de isobutirato de amonio y ácido cítrico, tal y como se muestra en el Cuadro VI, se inocularon con *Escherichia coli*, que se tomó de un cerdo con "diarrea blanca". Como se muestra en el Cuadro VI, aún

30 cuando una cantidad de 0,2 por ciento en peso de isobutira-

401328



to de amonio era ineficaz cuando se usó separadamente
 contra el Escherichia coli, cuando se usaron juntos se
 inhibió eficazmente el crecimiento de Escherichia coli.

5

CUADRO VI

Efectos Inhibitorios de las Combinaciones de Acido Cítrico
 e Isobutirato de NH₄ en E. coli^{**}

10

Isobutirato de NH ₄ (%)	Porcentaje de Acido Cítrico						
	0,0	0,0125	0,025	0,05	0,1	0,2	0,4
0,0	+	+	+	+	+	+	-
0,125	+	+	+	+	+	+	-
0,25	+	+	+	+	+	+	-
0,5	+	+	+	+	+	+	-
1,0	+	+	+	+	+	+	-
2,0	+	+	+	+	+	-	-
4,0	-	-	-	-	-	-	-

15

^{**} La hilera horizontal superior, representa la
 susceptibilidad al ácido cítrico solo; la columna verti-
 cal izquierda representa la susceptibilidad al isobutira-
 to de NH₄ solo. Concentración inhibitoria de la mezcla:
 0,2 por ciento de ácido cítrico más 2,0 por ciento de
 isobutirato de NH₄. El símbolo: + = crecimiento en tubo;
 - = ningún crecimiento visible.

20

25

EJEMPLO 35

30

Los corrales triplicados de 8 gallos Hubbard
 "white mountain" se criaron en una dieta de control regu-
 lar comercialmente obtenible que contenía 22 por ciento

401328

29



de proteína y 2 por ciento de sucrosa. La composición del alimento de porcentaje de cada ingrediente usado fueron los siguientes:

	Harina de frijol de soya	35,00%
5	maíz molido	55,63%
	Sal	0,50%
	Cal	1,37%
	Fosfato de dicalcio	2,00%
	Grasa	4,00%
10	Vitaminas y premezcla de minerales vestigiales	1,50%

* Vitaminas A, D₃, D₂, E, B₁₂, Riboflavina, niacina, ácido D-pantoténico, bisulfito de sodio de Menadiona, DL-metionina, Etoxiquina, Cloruro de colina.

15 Al mismo tiempo se usaron corrales triplicados idénticos y se efectuaron adicionales dietéticas a expensas de la sucrosa. Un grupo se alimentó con una dieta de control y el segundo grupo se alimentó prácticamente con la misma dieta de control conteniendo 0,1 por ciento de isobutirato de amonio y un tercer grupo se alimentó prácticamente con la misma dieta que contenía 0,5 por ciento de isobutirato de amonio y un cuarto grupo se alimentó con la dieta que contenía 1,0 por ciento de isobutirato de amonio, y el quinto grupo se alimentó con la dieta que contenía 2,0 por ciento de isobutirato de amonio. Los resultados, tal y como pueden verse en el Cuadro VII, demuestran que todos los pollos a los cuales se había alimentado el isobutirato de amonio, tenían una mejor eficiencia de alimentación que el grupo control y los pollos que recibían 0,5 por ciento de isobutirato de amonio exhibieron el mayor

20

25

30

401328 29



aumento en peso.

CUADRO VII

Efectos de Isobutirato de Amonio en el Crecimiento de

5 Pollos - Respuesta a la Dosis

Grupo No.	Tratamiento	Aumento ¹ gramos/pollo	Eficiencia de alimentación ²
	1 Control	728	1,55
10	2 + 0,1% de isobutirato de NH ₄	696	1,52
	3 + 0,5% de isobutirato de NH ₄	734	1,54
	4 + 1,0% de isobutirato de NH ₄	727	1,51
	5 + 2,0% de isobutirato de NH ₄	723	1,54

15 1 Aumento total por pollo a través de un período experimental de cuatro semanas. Cada número es el promedio de 24 pollos.

a gramos de alimento dividido entre gramos de aumento, promedio de tres duplicados.

20

Ejemplo 36

25 Dos juegos de corrales triplicados de 8 gallos Hubbard "white Mountain" se alimentaron con las dietas de 22 por ciento de proteína y 2 por ciento de sucrosa del Ejemplo 35. Sin embargo, en el segundo grupo se añadió 0,5 por ciento de isobutirato de amonio a expensas de la sucrosa. Se mantuvieron en los corrales condiciones idénticas. Como puede verse del Cuadro VIII, los pollos a los cuales se

30 había alimentado el isobutirato de amonio aumentaron en peso más rápidamente que los pollos de control y después

23.3.72

401328

29 MAR 1972



de un período de 4 semanas, mostraron eficiencias de alimentación superiores.

CUADRO VIII

5 Efectos del Isobutirato de Amonio en el
Crecimiento de los Pollos.

ESTUDIO

10	Semana	Aumento (gramos) ¹		Eficiencia de alimentación ²	
		Control	AIB ³	Control	AIB
	1	60	78	1,33	1,30
	2	204	227	1,33	1,34
	3	386	406	1,48	1,50
	4	583	667	1,72	1,56
15	1	Aumento total acumulativo por pollo a través de un período experimental de 4 semanas. Cada número es el promedio de 24 pollos.			
	2	Gramos acumulativos de alimento dividido entre el aumento en gramos, promedio de tres duplicados.			
20	3	Contenía 0,5 por ciento de isobutirato de amonio.			

25

REIVINDICACIONES

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta Solicitud de Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los

30

4013286



siguientes:

5 1ª.- Un procedimiento para preparar una composición que comprende un sustrato capaz de ser infectado por patógenos de planta y animal, por ejemplo sustancia alimenticia para animales, caracterizado porque comprende incorporar a dicho sustrato una cantidad de isobutirato de amonio o de potasio suficiente para inhibir el crecimiento de los patógenos en el sustrato.

10 2ª.- Un procedimiento de conformidad con la reivindicación 1ª, caracterizado porque la cantidad es de 0,25 a 2,0 por ciento en peso basado en el peso total de la composición.

15 3ª.- Un procedimiento de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1ª y 2ª, caracterizado porque el sustrato es una semilla.

20 4ª.- Un procedimiento de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1ª y 2ª, caracterizado porque el sustrato es una sustancia alimenticia, que se selecciona del grupo que consiste de maíz molido, triturado o entero, mijo, harina de cachuete, harina de semilla de algodón, trigo y ensilaje.

5ª.- Un procedimiento de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 4ª, caracterizado porque los patógenos son las especies

ME 25

401328



26 JUL. 1974

Sclerotium rolfsii, Rhizoctonia solani, Fusarium,
Pythium, Penicillium, Aspergillus, las especies
Candida albicans, Salmonella y de Escherichia coli.

5 6ª.- Un procedimiento de conformidad con
cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 5ª, caracte-
terizado porque se incluye un aditivo que se selec-
ciona del grupo que consiste de ácido cítrico, áci-
do acético y sulfato de laurilo de sodio.

10 7ª.- Un procedimiento de conformidad con
la reivindicación 6ª, caracterizado porque la com-
posición contiene de 0,1 a 0,4 por ciento en peso del
aditivo, basándose en el peso total de la composi-
ción.

15 8ª.- Un procedimiento de conformidad con
la reivindicación 6ª ó 7ª, caracterizado porque la
relación del aditivo al isobutirato queda dentro de
la escala de 0,1 a 1,67:1.

20 10ª.- Un procedimiento para preparar una
composición que comprende un substrato capaz de ser
infectado por patógenos de planta y animal.

ME

23.7.74

401328



26 JUL

Tal y como se ha descrito en la Memoria
que antecede y con los fines que se han especifica
do.

5 Esta Memoria consta de treinta hojas es-
critas a máquina por una sola cara.

Madrid 26 Julio 1974

P.A.

Alberto de Luna

10

m/c

23.7.74

DBF.

- 30 -