

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

|                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (22) Data de pedido: <b>2003.08.29</b>                                                                                                                                                | (73) Titular(es):<br><b>NOVUS INTERNATIONAL, INC.</b><br><b>530 MARYVILLE CENTRE DRIVE ST. LOUIS, MO</b><br><b>63141</b> <b>US</b>                                                                        |
| (30) Prioridade(s): <b>2002.08.30 US 407050 P</b><br><b>2003.01.21 US 441384 P</b><br><b>2003.01.21 US 441584 P</b><br><b>2003.03.21 US 456673 P</b><br><b>2003.03.21 US 456732 P</b> | (72) Inventor(es):<br><b>CHARLES S. SCHASTEEN</b> <b>US</b><br><b>JENNIFER WU</b> <b>US</b><br><b>PIERRE BUTTIN</b> <b>US</b><br><b>PIETER HILLEBRAND</b> <b>US</b><br><b>FREDRICK R. SCOTT</b> <b>US</b> |
| (43) Data de publicação do pedido: <b>2005.05.25</b>                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                           |
| (45) Data e BPI da concessão: <b>2011.06.01</b><br><b>167/2011</b>                                                                                                                    | (74) Mandatário:<br><b>ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA</b><br><b>RUA DAS FLORES, N.º 74, 4.º AND 1249-235 LISBOA</b> <b>PT</b>                                                                     |

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES ANTIMICROBIANAS**

(57) Resumo:

REVELAM-SE COMPOSIÇÕES E COMBINAÇÕES ANTIMICROBIANAS COMPREENDENDO UM COMPOSTO DE FÓRMULA I EM QUE R1, R2, R3 E N SÃO TAL COMO AQUI DEFINIDOS.

RESUMO

**"Composições antimicrobianas"**

Revelam-se composições e combinações antimicrobianas compreendendo um composto de Fórmula I em que R1, R2, R3 e n são tal como aqui definidos.

## DESCRIÇÃO

### **"Composições antimicrobianas"**

#### CAMPO DO INVENTO

O presente invento refere-se na generalidade a proporcionar uma composição antimicrobiana e métodos de controlar o crescimento, prevenir o crescimento ou matar organismos microbianos. Em particular, o invento refere-se a uma composição antimicrobiana compreendendo ácido 2-hidroxi-4-(metiltio)butanóico e dois outros ácidos orgânicos seleccionados dos ácidos butírico, láctico, fórmico e propiónico, sua preparação e sua utilização para inibir ou matar salmonela em alimentos.

#### ANTECEDENTES DO INVENTO

O controlo bacteriano em rações para animais é um desafio contínuo para a indústria, ainda mais premente à medida que os consumidores se focam na saúde e segurança da carne com que alimentam as suas famílias. O controlo bacteriano é desejável para proteger a saúde do animal para o qual se pretende a ração. As bactérias intestinais do animal competem para os nutrientes e podem ser prejudiciais à saúde e desempenho do animal. Em segundo lugar e com uma importância crescente, a redução de bactérias na ração é uma parte importante da redução e controlo de doenças transportadas pelas rações.

A utilização de antibióticos nas rações para animais tem estado recentemente sob escrutínio, em parte devido ao receio da sobre-utilização de antibióticos poder causar resistência aos antibióticos nos animais tratados. Adicionalmente, através do consumo de animais tratados com antibióticos, os humanos podem ter problemas devidos a alergias aos antibióticos ou tornando-se também resistentes aos antibióticos. Assim, existe uma necessidade de meios alternativos de inibir bactérias nas rações para animais.

Existem actualmente duas alternativas principais para o controlo de bactérias nas rações: métodos térmicos e químicos. O tratamento térmico das rações é dispendioso, mas eficaz. No

entanto, apenas o tratamento térmico não evita a recontaminação das rações entre a altura em que a ração é tratada e a altura em que é consumida pelo animal.

Os tratamentos químicos envolvem principalmente a utilização de formaldeído ou de um ácido orgânico na ração. O formaldeído tem sido amplamente utilizado no Reino Unido, embora a sua utilização ainda esteja em avaliação na União Europeia.

Por outro lado, os ácidos orgânicos têm muitas aplicações na indústria de rações para animais em todo o mundo. Durante muitos anos, os nutricionistas têm utilizado ácidos orgânicos em dietas de leitões pelo seu efeito positivo na saúde e crescimento. Por exemplo, utiliza-se ácido fórmico para descontaminar matérias-primas e utiliza-se ácido propiónico para controlar bolor. Outros ácidos orgânicos utilizados usualmente incluem ácidos fumárico, cítrico e láctico. Sabe-se também que os ácidos orgânicos modificam a flora gastrointestinal.

A autorização para a utilização de antibióticos não terapêuticos em rações para animais foi revogada em vários países e a prática de rações com promotores de crescimento em baixa dose está a desaparecer rapidamente em todo o mundo. Já actualmente, os produtores que querem vender no mercado de produtos isentos de fármacos estão à procura de substitutos não farmacêuticos para antibióticos para rações. A maioria dos dados sugere que o efeito de promoção de crescimento de antibióticos pode ser completamente atribuído à sua actividade antimicrobiana e às suas repercussões fisiológicas. Assim, a procura de substitutos tem-se centrado em moléculas de ocorrência natural com actividade antimicrobiana conhecida.

O principal efeito dos antibióticos é antimicrobiano; todos os efeitos de digestibilidade e desempenho podem ser explicados pelo seu impacto na microflora gastrointestinal e pela redução da estimulação imunitária resultante. Os ácidos orgânicos têm actividade antimicrobiana; no entanto, parecem existir efeitos dos ácidos orgânicos além dos atribuídos a actividade antimicrobiana. A redução de determinadas espécies de bactérias está associada com a alimentação com ácidos

orgânicos, que são particularmente eficazes contra espécies intolerantes a ácidos, tais como *E. coli*, *Salmonella* e *Campylobacter*. Tais antibióticos e ácidos orgânicos melhoram a digestibilidade de proteína e energia através da diminuição da incidência de estimulação imunitária basal e a síntese e excreção de mediadores imunitários resultante, através da redução da produção de amônia e outros metabólitos microbianos de depressão de crescimento e talvez através de redução da carga microbiana global. Contrariamente aos antibióticos, a actividade antimicrobiana dos ácidos orgânicos é dependente do pH. Os ácidos orgânicos apresentam um benefício evidente e significativo em leitões de desmame e têm sido verificados benefícios no desempenho de aves de capoeira. Os ácidos orgânicos têm vários efeitos adicionais que vão além dos antibióticos. Tais incluem redução do pH da massa alimentar e aumento da excreção pancreática.

Os porcos são susceptíveis a stress do desmame (separação das mães, alterações ambientais e efeitos físicos da alimentação sólida) e a uma variedade de patogénios, tais como *E. coli* e rotavírus. Estes patogénios são reduzidos nos animais adultos através da redução do pH do estômago, mas os porcos jovens apresentam menor excreção de ácido clorídrico no estômago. Além disso, a incapacidade de acidificar o conteúdo gástrico acoplada a baixa excreção de enzima pancreática pode levar a uma insuficiente digestão de nutrientes e também a um aumento da susceptibilidade de leitões de desmame a doenças entéricas.

Vários estudos documentaram os efeitos de ácidos orgânicos no desempenho de porcos jovens, particularmente em leitões com desmame precoce. Uma publicação recente de Partanen ("Organic acids: their efficacy and modes of action in pigs" em Gut Environment of Pigs, p. 201, Piva, A. et al., ed., Nottingham University Press, Nottingham, UK (2001)) apresenta uma revisão da literatura nesta área e apresenta os resultados de uma meta-análise dos dados existentes. Apenas se consideraram os estudos que utilizam ácidos individuais na ausência de antibióticos e cobre. Na análise de 46 ensaios com leitões desmamados e 23 com porcos de engorda, verificaram-se melhorias significativas da taxa alimentação-ganho com ácidos fórmico, fumárico e cítrico e também com diformato de cálcio.

Os efeitos no ganho de peso e ingestão de alimentos foram significativos para ácido fórmico e diformato. O autor concluiu que os ácidos na dieta apresentam um efeito benéfico, especialmente em leitões desmamados, que está principalmente associado a alterações da microflora gastrointestinal. Consultar Eidelsburger et al., J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 68: 82-92 (1992).

Sem restrições a uma determinada teoria, pensa-se que um mecanismo de acção de ácidos orgânicos como agentes antimicrobianos é o seguinte. O ácido muda as populações microbianas de acordo com o seu espectro de actividade antimicrobiana. Uma vez no interior das células, a mudança de pH provoca a dissociação destes ácidos fracos. Os efeitos múltiplos de ácidos orgânicos são devidos a esta dissociação intracelular e da consequente resposta celular. A actividade antimicrobiana é resultado dos efeitos nocivos do protão livre e, possivelmente, do anião livre na célula bacteriana ou fúngica. Pensa-se que, nos enterócitos intestinais, a dissociação resulta na síntese de secretina, uma hormona que estimula excreção pancreática. Assim, os ácidos orgânicos apresentam benefícios que vão além da actividade antimicrobiana. Para rações, a actividade de controlo de crescimento de fungos é dominante, enquanto no intestino as populações que são afectadas são principalmente as de bactérias cujo crescimento é mais afectado pelas condições acídicas. No entanto, deve salientar-se que o mecanismo de acção de ácidos orgânicos é muito diferente e cumulativo com o de ácidos inorgânicos, tal como HCl. Consultar, e.g., Eidelsburger et al., supra. A importância de pH baixo na actividade antimicrobiana de ácidos orgânicos pode ser explicada pelo seu efeito na dissociação do ácido. A pH baixo, uma maior quantidade de ácido orgânico estará sob a forma não dissociada. Os ácidos orgânicos não dissociados são lipofílicos e podem difundir através das membranas celulares, incluindo as de bactérias e bolores. Consultar Huyghebaert, Report: CLO-DVV (1999) e Eidelsburger et al., supra. Uma vez dentro da célula bacteriana, o pH mais elevado do seu citoplasma provoca dissociação do ácido e a diminuição de pH do conteúdo celular resultante apresentará os efeitos de interrupção de reacções enzimáticas e sistemas de transporte de nutrientes. Consultar Cherrington et al., Adv. Microb.

Physio., 32:87-108 (1991). Além disso, o processo de transporte do próton livre para o exterior da célula requer energia e tal contribui para uma redução da energia disponível para proliferação, resultando em bacteriostase em algum grau. Pensa-se que esta actividade antimicrobiana directa é responsável pelos efeitos de sanitização de ração e alimentos que contribuem para a utilização de ácidos orgânicos como conservantes.

A maior parte dos animais de produção de alimentos, especialmente, porcos, aves de capoeira e gado, necessitam de suplemento de metionina nas suas dietas para um crescimento e reprodução adequados. O ácido 2-hidroxi-4-(metiltio)butanóico (HMBA, comercializado com a denominação comercial Alimet<sup>®</sup> por Novus International, Inc. (St. Louis, Missouri)) é uma fonte popular de suplemento de metionina para dietas animais. Alimet<sup>®</sup> tornou-se uma fonte preferida comparativamente a D,L-metionina (DLM) em pó, para fábricas de ração que pretendem resolver os problemas comuns associados com o aumento da capacidade de produção, devido às vantagens em termos de eficiência da forma física de líquidos. Algumas das características populares são um mais fácil manuseamento da matéria-prima, maior exactidão de dosagem, eliminação de embalagens e sua eliminação e problemas de redução de inventário, bem como redução de poeiras. Alimet<sup>®</sup> contém 88% de actividade de metionina, enquanto DLM líquido contém apenas 40% de actividade de metionina. Este baixo nível de actividade relativa de DLM significa que a água ocupa o lugar de componentes valiosos em energia e proteína na ração, reduzindo a densidade de nutrientes.

A prevenção ou atraso do crescimento de bolor em composições de rações para animais é benéfico, dado que se perde menos ração para o lixo e podem ser evitadas doenças associadas aos bolores ou às toxinas produzidas por eles.

O bolor nas rações de alimentação pode tornar a ração imprópria para consumo. A ração com bolor pode diminuir a digestibilidade e/ou prejudicar o sabor da ração e ambos podem afectar nocivamente a produção e saúde do animal. Adicionalmente, muitos bolores produzem micotoxinas que afectam o valor nutricional da ração ou podem ser perigosos

para a saúde dos animais, incluindo gado e humanos. A micotoxina aflatoxina B<sub>1</sub> de *Aspergillus* é um carcinogéneo do fígado potente; determinadas micotoxinas de *Penicillium* afectam a função hepática ou renal; e a espécie de bolor *Fusarium* está associada a edema pulmonar em suínos, cancro do fígado em rato e desenvolvimento anómalo do osso em galinhas e porcos. Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, "Grain Fungal Diseases & Mycotoxin Reference" disponível em <http://www.usda.gov/gipsa/pubs/pubs.htm>. Os porcos são particularmente sensíveis à presença de micotoxinas de *Fusarium*, especialmente desoxinivalenol (DON), também denominado vomitoxina.

A anulação da toxicidade de ração contaminada com micotoxinas pode ser bastante difícil e frequentemente é apenas conseguida sujeitando a ração a condições de processamento extremas. Por exemplo, a toxicidade de milho contaminado com aflatoxina, uma micotoxina produzida pela espécie de bolor *Aspergillus*, pode ser anulada por tratamento do milho sob pressão com amoníaco húmido a quente. Assim, existe a necessidade de uma forma de evitar a formação de bolor e das micotoxinas que estes possam produzir.

O crescimento de bolor em rações não tratadas armazenadas é especialmente prevalente em condições quentes e húmidas. As temperaturas mais elevadas aumentam a probabilidade de crescimento de bolor, em particular quando acopladas a níveis de humidade elevados na ração. Na ração para galinhas, raramente ocorre crescimento de bolor em grãos contendo menos de 14-15% de humidade. No entanto, mesmo as rações com baixos níveis de humidade podem ter zonas com níveis de humidade elevados, produzindo microclimas ideais para o crescimento de bolor. Tal acontece frequentemente em climas mais quentes, especialmente quando as temperaturas nocturnas mais baixas causam condensação dentro de silos ou contentores em que se armazenam os grãos ou ração. Mesmo estas zonas relativamente pequenas de crescimento de bolor podem ser problemáticas; as micotoxinas podem ser problemáticas para pássaros a níveis de partes por milhão (e.g., tricotecenos, produzidos pela espécie *Fusarium* e aflatoxinas, produzidas pela espécie *Aspergillus*).



Sabe-se que determinados aditivos de rações podem evitar o crescimento de bolor (i.e., actuar como antifúngicos) ou ligarem micotoxinas existentes. Tais aditivos são frequentemente utilizados quando o controlo da humidade no grão ou ração misturada é difícil logisticamente. É conhecida a utilização de determinados ácidos orgânicos, incluindo ácido propiónico e ácido acético, como inibidores de bolor. Os adsorventes que ligam micotoxinas incluem aluminossilicatos e produtos limo-argilosos, cuja estrutura química permite a captura de aflatoxina e talvez de outras micotoxinas. Os adsorventes de micotoxinas têm eficácia variável, devido em parte às suas características de ligação variáveis. A utilização de um inibidor de bolor separado ou de adsorvente de bolor aumenta os custos associados à ração para animais.

Um estudo anterior (Doerr et al., Poultry Science, 74(1), 23 (1995)) sugeriu que Alimet<sup>®</sup> pode reduzir o crescimento de bolor em amostras de meio de dextrose de Sabouraud, ágar-ágar de dextrose de batata ou milho triturado (19% de humidade) tratados com *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus*, ou *Fusarium moniliforme* e em milho triturado (17,5% de humidade) com a sua flora fúngica de ocorrência natural.

O melhoramento do sabor da ração para animais é uma tarefa interminável dos fabricantes de ração. A adição de intensificador de sabor à ração é desejável como um meio de aumentar a aceitação pelos animais, resultando em melhor saúde do animal, melhor aumento de peso, etc. Os intensificadores de sabor são utilizados frequentemente em rações para caninos, felinos e aquacultura.

#### SUMÁRIO DO INVENTO

O presente invento proporciona uma composição antimicrobiana compreendendo ácido 2-hidroxi-4-(metiltio)butanóico e dois outros ácidos orgânicos seleccionados de ácido butírico, ácido láctico, ácido fórmico e ácido propiónico.

Num outro aspecto, o presente invento proporciona um método para preparar uma composição antimicrobiana compreendendo misturar ácido 2-hidroxi-4-(metiltio)butanóico C

doravante denominado composto de fórmula (I) com outros dois ácidos orgânicos seleccionados de ácido butírico, ácido láctico, ácido fórmico e ácido propiónico.

O invento também proporciona a utilização de uma composição antimicrobiana tal como definida anteriormente para inibir ou matar salmonela em ração.

#### DESCRIÇÃO SUCINTA DOS ESQUEMAS

A **figura 1A** é um gráfico que ilustra o efeito da variação da dose (0,108, 0,3 e 0,83 g/L) de ácido fórmico e Alimet<sup>®</sup> a pH 4,5 e 6,75 no número de unidades formadoras de colónias de *S. enteritidis* após 4 horas.

A **figura 1B** é um gráfico que ilustra o efeito da variação da dose (0,108, 0,3 e 0,83 g/L) de ácido fórmico e Alimet<sup>®</sup> a pH 4,5 e 6,75 no número de unidades formadoras de colónias de *E. coli* após 4 horas.

A **figura 1C** é um gráfico que ilustra o efeito da variação da dose (0,108, 0,3 e 0,83 g/L) de ácido fórmico e Alimet<sup>®</sup> a pH 4,5 e 6,75 no número de unidades formadoras de colónias de *L. plantarum* após 6 horas.

A **figura 1D** é um gráfico que ilustra o efeito da variação da dose (0,108, 0,3 e 0,83 g/L) de ácido fórmico e Alimet<sup>®</sup> a pH 4,5 e 6,75 no número de unidades formadoras de colónias de *C. jejuni* após 6 horas.

A **figura 2A** é um gráfico que ilustra o efeito antibacteriano dependente do pH de ácido fórmico e Alimet<sup>®</sup> no número de unidades formadoras de colónias de *S. enteritidis*.

A **figura 2B** é um gráfico que ilustra o efeito antibacteriano dependente do pH de ácido fórmico e Alimet<sup>®</sup> no número de unidades formadoras de colónias de *E. coli*.

A **figura 2C** é um gráfico que ilustra o efeito antibacteriano dependente do pH de ácido fórmico e Alimet<sup>®</sup> no número de unidades formadoras de colónias de *L. plantarum*.

A **figura 2D** é um gráfico que ilustra o efeito antibacteriano dependente do pH de ácido fórmico e Alimet<sup>®</sup> no número de unidades formadoras de colónias de *C. jejuni*.

A **figura 3** é um gráfico que ilustra o efeito da variação da dose (1, 3 e 5 g/L) de ácido fórmico e Alimet<sup>®</sup> no número de unidades formadoras de colónias de *S. enteritidis* após 4 horas a pH 4,5 e 6,75.

As **figuras 4A e 4B** são gráficos que ilustram o efeito da variação da dose de uma combinação de ácido fórmico e Alimet<sup>®</sup> no número de unidades formadoras de colónias de *S. enteritidis* após 4 horas a pH 4,5 e 6,75.

A **figura 5** é um gráfico que compara os efeitos de ácido clorídrico, ácido fórmico, ácido láctico e Alimet<sup>®</sup> no número de unidades formadoras de colónias de *E. coli* ao longo do tempo, a pH 4 e 7,3.

A **figura 6** é um gráfico que apresenta o efeito do nível de humidade no número de unidades formadoras de colónias de *Salmonella* em pré-mistura de ração de carne.

A **figura 7** é um gráfico que apresenta a percentagem de recuperação de *Salmonella* para diferentes níveis de Alimet<sup>®</sup> em pré-mistura de ração de carne contendo 20% de humidade.

A **figura 8** é um gráfico que apresenta o efeito Alimet<sup>®</sup> no número de unidades formadoras de colónias de *Salmonella* em pré-mistura de ração de carne contendo 20% de humidade.

A **figura 9** é um gráfico que ilustra a %CO<sub>2</sub> no espaço livre do recipiente de uma ração para pintos com um nível de humidade de 16,8% sem DLM ou Alimet<sup>®</sup>; com DLM a 0,2%; e com Alimet<sup>®</sup> a 0,2%.

A **figura 10** é um gráfico que ilustra a %CO<sub>2</sub> no espaço livre do recipiente de uma ração para pintos com um nível de humidade de 14,8% sem DLM ou Alimet<sup>®</sup>; com DLM a 0,2%; e com Alimet<sup>®</sup> a 0,2%.

A **figura 11** é um gráfico que ilustra a %CO<sub>2</sub> no espaço livre do recipiente de uma ração para pintos com um nível de humidade de 12,8% sem DLM ou Alimet®; com DLM a 0,2%; e com Alimet® a 0,2%.

A **figura 12** é um gráfico que ilustra a %CO<sub>2</sub> no espaço livre do recipiente de uma ração para pintos com um nível de humidade de 14,8% sem DLM ou Alimet®; com DLM a 0,2%; e com Alimet® a 0,2%; com 2 libras/tonelada de ácido propiónico a 65% e DLM a 0,2%; com 1,5 libras/tonelada de ácido propiónico a 65% e DLM a 0,2%; e com 1,0 libras/tonelada de ácido propiónico a 65% e DLM a 0,2%.

A **figura 13** é um gráfico que ilustra a %CO<sub>2</sub> no espaço livre do recipiente de uma ração para pintos com um nível de humidade de 14,8% com 2 libras/tonelada de ácido propiónico a 65%; com 1,0 libras/tonelada de ácido propiónico a 65%; e com 1,0 libras/tonelada de ácido propiónico a 65% e Alimet® a 0,2%.

A **figura 14** é um gráfico que ilustra a %CO<sub>2</sub> no espaço livre do recipiente de uma ração para pintos com um nível de humidade de 14,8% com 2 libras/tonelada de ácido propiónico a 65%; com 1,5 libras/tonelada de ácido propiónico a 65%; e com 1,5 libras/tonelada de ácido propiónico a 65% e Alimet® a 0,2%.

A **figura 15** é um gráfico que ilustra a %CO<sub>2</sub> no espaço livre do recipiente de uma ração para pintos tratada com ácido propiónico e ácido propiónico com Alimet® a 0,2% com um nível de humidade de 16,8%, 14,8%, 12,8%.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA

Os sais representativos do composto de Fórmula I incluem os sais de amónio, magnésio, cálcio, lítio, sódio, potássio, selénio, ferro, cobre e zinco. Numa concretização preferida, o composto de Fórmula I está sob a forma do sal de cálcio. As amidas representativas do composto de fórmula (I) incluem metilamida, dimetilamida, etilmetilamida, butilamida, dibutilamida, butilmetilamida, alquiléster de N-acilmetionatos (e.g., N-acetil-metionatos de alquilo. Os ésteres

representativos do composto de fórmula (I) incluem os ésteres de metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, butilo, nomeadamente ésteres de n-butilo, sec-butilo, isobutilo e t-butilo, ésteres de pentilo e ésteres de hexilo, especialmente ésteres de n-pentilo, isopentilo, n-hexilo e iso-hexilo.

De preferência, a concentração do composto de Fórmula I nas composições de ração aqui descritas é entre cerca de 0,01% e cerca de 5%. Em várias concretizações preferidas, a concentração é entre 0,01% e cerca de 4%; entre 0,02% e cerca de 3%; entre 0,03% e cerca de 2%; entre 0,04% e cerca de 1%; entre cerca de 0,05% e cerca de 0,6%; e entre cerca de 0,06% e cerca de 0,525%. Em várias concretizações particularmente preferidas a concentração é cerca de 0,075%; cerca de 0,125%; cerca de 0,15%; cerca de 0,225%; cerca de 0,25%; cerca de 0,3%; cerca de 0,375%; e cerca de 0,5%.

Os micróbios nas rações para animais podem ser inibidos por tratamento da referida ração com um composto de Fórmula I e dois outros ácidos orgânicos, tal como definido anteriormente.

De preferência, a concentração combinada do composto de Fórmula I e a mistura de ácidos orgânicos nas composições antimicrobianas aqui descritas para mistura com ração é entre cerca de 0,01% e cerca de 5%. Em várias concretizações preferidas, a concentração combinada é entre cerca de 0,015% e cerca de 4%; entre cerca de 0,02% e cerca de 3%; entre cerca de 0,05% e cerca de 2,5%; entre cerca de 0,075% e cerca de 2%; entre cerca de 0,1% e cerca de 1,5%; entre cerca de 0,15% e cerca de 1%; entre cerca de 0,4% e cerca de 0,9%; entre cerca de 0,5% e cerca de 0,8%; entre cerca de 0,01% e cerca de 5%; entre cerca de 0,01% e cerca de 4,5%; entre cerca de 0,05% e cerca de 4%; entre cerca de 0,08% e cerca de 3%; entre cerca de 0,1% e cerca de 2,5%; entre cerca de 0,01% e cerca de 0,8%; entre cerca de 0,01% e cerca de 0,5%; entre cerca de 0,05% e cerca de 0,6%; e entre cerca de 0,06% e cerca de 0,525%.

Numa concretização preferida do presente invento, a composição antimicrobiana compreende adicionalmente um agente de acidificação. Um agente de acidificação é tipicamente um ácido forte, de preferência um ácido mineral. Os exemplos de

tais agentes de acidificação incluem ácido fosfórico, ácido fosforoso, ácido sulfúrico, ácido clorídrico, ácido bromídrico e ácido nítrico. Numa concretização, o agente de acidificação é ácido fosfórico.

De preferência, o pH da ração está entre cerca de 3 e cerca de 8. Ainda com maior preferência, o pH está entre cerca de 4 e cerca de 7. Ainda com maior preferência, o pH está entre cerca de 4,5 e cerca de 6,75. O pH pode ser medido tomando uma quantidade conhecida de ração e colocando-a numa quantidade conhecida de água destilada. O pH da solução resultante, após sedimentação, pode ser medido por qualquer meio padrão de medição de pH.

Numa concretização preferida, o ácido orgânico mencionado anteriormente é uma mistura de ácido fórmico e ácido propiônico, em que o ácido fórmico compreende desde cerca de 95% a cerca de 5% da mistura de ácidos orgânicos e o ácido propiônico compreende desde cerca de 5% a cerca de 95% da mistura de ácidos orgânicos. De preferência, o ácido fórmico compreende desde cerca de 85% a cerca de 15% da mistura de ácidos orgânicos e o ácido propiônico compreende desde cerca de 15% a cerca de 85% da mistura de ácidos orgânicos. Noutra concretização preferida, o ácido fórmico compreende desde cerca de 85% a cerca de 65% da mistura de ácidos orgânicos e o ácido propiônico compreende desde cerca de 15% a 35% da mistura de ácidos orgânicos. Noutra concretização preferida, o ácido fórmico compreende cerca de 75% da mistura de ácidos orgânicos e o ácido propiônico compreende cerca de 25% da mistura de ácidos orgânicos. Esta mistura de ácido fórmico/propiônico pode então ser combinada com o composto de Fórmula I de acordo com as razões descritas anteriormente.

Numa concretização preferida, as composições antimicrobianas podem compreender adicionalmente um ou mais componentes seleccionados de um terceiro ácido orgânico e um agente de acidificação. De preferência, o terceiro ácido orgânico é seleccionado do grupo que consiste de ácido fórmico, ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico, ácido benzóico, ácido láctico, ácido málico, ácido tartárico, ácido mandélico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido sórbico, ácido bórico, ácido succínico, ácido adípico, ácido glicólico

e ácido glutárico. De preferência, o agente de acidificação é seleccionado do grupo que consiste de ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido fosforoso, ácido clorídrico, ácido bromídrico e ácido nítrico.

Verificou-se que determinadas composições antimicrobianas do invento apresentam um odor melhorado comparativamente a composições similares sem Alimet<sup>®</sup>. Por exemplo, as misturas compreendendo ácido fórmico apresentam um odor pungente. Em tais misturas sem Alimet<sup>®</sup>, este odor é mais facilmente detectável do que nas mesmas misturas contendo Alimet<sup>®</sup>. Sem nos limitarmos a uma determinada teoria, pensa-se que o Alimet<sup>®</sup> nas misturas pode baixar a pressão de vapor dos outros ácidos orgânicos nas misturas. Alternativamente, o Alimet<sup>®</sup> pode mascarar os odores desagradáveis.

As bactérias nas silagens podem ser inibidas por tratamento da referida silagem com uma composição antibacteriana compreendendo um composto de Fórmula I e um ou mais ácidos orgânicos tal como descrito anteriormente. De preferência, adiciona-se o composto de Fórmula I e outro(s) ácido(s) orgânico(s) à silagem a cerca de 2 libras/tonelada a 125 libras/tonelada da forragem fresca combinada. Numa concretização, adiciona-se o composto de Fórmula I e outros ácidos orgânicos à silagem a cerca de 4 libras/tonelada a 100 libras/tonelada de forragem fresca combinada. Noutra concretização, adiciona-se o composto de Fórmula I e outros ácidos orgânicos à silagem a cerca de 5 libras/tonelada a 90 libras/tonelada de forragem fresca combinada, com maior preferência cerca de 7 libras/tonelada a 80 libras/tonelada de forragem fresca combinada, com maior preferência cerca de 8 libras/tonelada a 70 libras/tonelada de forragem fresca combinada, com maior preferência cerca de 9 libras/tonelada a 60 libras/tonelada de forragem fresca combinada, com maior preferência cerca de 10 libras/tonelada a 55 libras/tonelada de forragem fresca combinada, com maior preferência cerca de 12 libras/tonelada a 50 libras/tonelada de forragem fresca combinada, com maior preferência cerca de 15 libras/tonelada a 30 libras/tonelada de forragem fresca combinada. Opcionalmente, as composições podem compreender adicionalmente um agente de acidificação, tal como aqui descrito.

A composição antimicrobiana do invento pode inibir bactérias da família de *Enterobacteriaceae*, *Campylobacter* ou *Lactobacillaceae*. Por exemplo *L. plantarum* ou *C. jejuni*. Numa determinada concretização especialmente preferida, a bactéria é da família de *Enterobacteriaceae*. Numa concretização ainda mais preferida, a bactéria é do género *Salmonella* ou *Escherichia*. Numa concretização ainda mais preferida, a bactéria é *S. enteritidis* ou *E. coli*.

O composto de Fórmula I mencionado anteriormente e os ácidos orgânicos anteriormente mencionados podem ser utilizados num método para inibir bactérias em ração para animais compreendendo calcular a concentração na referida ração do composto de Fórmula I e a mistura de ácidos orgânicos para inibir bactérias presentes na referida ração animal e aplicar o referido composto de Fórmula I e a referida mistura de ácidos orgânicos à referida ração numa quantidade suficiente para atingir a referida concentração.

Numa outra concretização do presente invento, o composto de Fórmula I anteriormente mencionado e os ácidos orgânicos anteriormente mencionados podem ser utilizados num método para inibir bolor em ração para animais compreendendo disponibilizar directa ou indirectamente informação para calcular a concentração na referida ração do referido composto de Fórmula I e da referida mistura de ácidos orgânicos necessária para inibir bactérias presentes na referida ração para animais e, directa ou indirectamente, disponibilizando informação para aplicar o referido composto de Fórmula I e a referida mistura de ácidos orgânicos à referida ração numa quantidade suficiente para atingir a referida concentração.

As rações para animais mencionadas anteriormente podem ser tratadas termicamente, antes ou após administração do composto de Fórmula I e ácidos orgânicos anteriormente mencionados.

O tratamento das composições de ração para animais com o composto de Fórmula I e com outros ácidos orgânicos aqui revelado pode ser efectuado misturando o composto de Fórmula I e outros ácidos orgânicos com os outros ingredientes na ração, tais como milho, ração de soja, pré-mistura de ração de carne, outros suplementos de ração, etc., quando se formula a ração.



Alternativamente, o composto de Fórmula I e outro(s) ácido(s) orgânico(s) podem ser aplicados a uma ração em pré-mistura ou pré-granulado. Em qualquer dos casos, de preferência adiciona-se o composto de Fórmula I e outro(s) ácido(s) orgânico(s) como líquidos e dispersam-se uniformemente em toda a composição de ração quando aplicados. De preferência misturam-se o referido composto de Fórmula I e os referidos outros ácidos orgânicos conjuntamente antes de aplicação à ração animal. Esta mistura pré-misturada de composto de Fórmula I/ácidos orgânicos pode ser aplicada aos ingredientes de ração para animais durante a formulação das composições de ração ou podem ser aplicadas à ração pré-misturada ou pré-granulada.

O bolor em ração para animais pode ser inibido tratando a referida ração com uma quantidade eficaz antifúngica de um composto de Fórmula I e um ou mais ácidos orgânicos, tal como aqui descrito anteriormente.

O composto de Fórmula I anteriormente mencionado e os ácidos orgânicos anteriormente mencionados podem ser utilizados num método para atrasar a formação de bolor numa composição de ração para animais, compreendendo o método aplicar um composto de Fórmula I e um ou mais ácidos orgânicos à referida composição de ração, em que a referida composição de ração compreende milho e soja. Noutra concretização, o teor de humidade é pelo menos 10%.

O composto de Fórmula I anteriormente mencionado e os ácidos orgânicos anteriormente mencionados podem ser utilizados num método para inibir a formação de bolor numa composição para ração para animais, em que o método compreende aplicar um composto de Fórmula I e um ou mais ácidos orgânicos à referida composição de ração, em que a referida composição de ração tem um teor de humidade de cerca de 17% ou menos. De preferência, o teor de humidade é pelo menos 0,01%. Noutra concretização, o teor de humidade é pelo menos 1%. Noutra concretização, o teor de humidade é pelo menos 5%. Noutra concretização, o teor de humidade é pelo menos 10%.

O composto de Fórmula I e os ácidos orgânicos mencionados anteriormente podem ser utilizados num método para inibir o crescimento de bolor numa composição de ração para animais, em

que o método compreende calcular a concentração na referida ração do composto de Fórmula I e mistura de ácidos orgânicos necessária para inibir o crescimento de bolor da referida composição de ração; e aplicar o referido composto de Fórmula I e a referida mistura de ácidos orgânicos à referida composição de ração na referida concentração.

O composto de Fórmula I e os ácidos orgânicos mencionados anteriormente podem ser utilizados num método para inibir o crescimento de bolor numa ração para animais compreendendo calcular a concentração na referida ração do composto de Fórmula I e mistura de ácidos orgânicos necessária para inibir o crescimento de bolor na referida ração para animais; e aplicar o referido composto de Fórmula I e a referida mistura de ácidos orgânicos à referida ração, na referida concentração.

O composto de Fórmula I mencionado anteriormente e os referidos ácidos orgânicos podem ser utilizados num método para melhorar a resistência a bolor de uma composição de ração para animais, em que o método compreende descontinuar a utilização de DL-metionina como um suplemento de ração; calcular a concentração na referida ração do composto de Fórmula I e da mistura de ácidos orgânicos necessária para inibir o crescimento de bolor na referida ração para animais; e aplicar o referido composto de Fórmula I e a referida mistura de ácidos orgânicos à referida ração, na referida concentração.

O composto de Fórmula I e os ácidos orgânicos anteriormente mencionados podem ser utilizados num método para inibir bolor na ração para animais disponibilizando informação directa ou indirectamente para calcular a concentração na referida ração do referido composto de Fórmula I e a concentração da referida mistura de ácidos orgânicos necessária para inibir bolor presente na referida ração para animais; e disponibilizando informação directa ou indirectamente para aplicar o referido composto de Fórmula I e a referida mistura de ácidos orgânicos à referida ração, na referida concentração.

Em várias concretizações preferidas, as composições ou combinações compreendem adicionalmente um agente de acidificação seleccionado do grupo que consiste de ácidos minerais, de preferência seleccionados do grupo que consiste de ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido fosforoso, ácido clorídrico, ácido bromídrico e ácido nítrico; e/ou um terceiro ácido orgânico seleccionado do grupo que consiste de ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido benzóico, ácido láctico, ácido málico, ácido tartárico, ácido mandélico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido sórbico, ácido bórico, ácido succínico, ácido adípico, ácido glicólico e ácido glutárico.

Numa concretização ainda mais preferida, as composições e combinações aqui descritas compreendem HMBA, ácido fórmico, ácido propiónico e ácido fosfórico. De preferência, o teor de HMBA é desde cerca de 5% a cerca de 20% da soma do teor de HMBA, ácido fórmico, ácido propiónico e ácido fosfórico; o teor de ácido fórmico é desde cerca de 65% a cerca de 85% da referida soma; o teor de ácido propiónico é desde cerca de 1% a cerca de 15% da referida soma; e o teor de ácido fosfórico é desde cerca de 5% a cerca de 20% da referida soma. Ainda com maior preferência, o teor de HMBA é cerca de 10% da referida soma; o teor de ácido fórmico é cerca de 75% da referida soma; o teor de ácido fosfórico é cerca de 5% da referida soma; e o teor de ácido fosfórico é cerca de 10% da referida soma. Alternativamente, o teor de HMBA é desde cerca de 20% a cerca de 40% da referida soma, o teor de ácido fórmico é desde cerca de 45% a cerca de 65% da referida soma, o teor de ácido propiónico é desde cerca de 1% a cerca de 20% da referida soma e o teor de ácido fosfórico é desde cerca de 1% a cerca de 15% da referida soma; ainda com maior preferência, o teor de HMBA é cerca de 30% da referida soma, o teor de ácido fórmico é cerca de 55% da referida soma, o teor de ácido propiónico é cerca de 10% da referida soma e o teor de ácido fosfórico é cerca de 5% da referida soma.

Numa outra concretização mais preferida, as composições e combinações aqui descritas compreendem HMBA, ácido butírico, ácido láctico e ácido fosfórico. De preferência, o teor de HMBA é desde cerca de 20% a cerca de 40% da soma do teor de HMBA, ácido butírico, ácido láctico e ácido fosfórico; o teor

de ácido butírico é desde cerca de 10% a cerca de 30% da referida soma; o teor de ácido láctico é desde cerca de 10% a cerca de 30% da referida soma; e o teor de ácido fosfórico é desde cerca de 20% a cerca de 40% da referida soma. Ainda com maior preferência, o teor de HMBA é cerca de 30% da referida soma; o teor de ácido butírico é cerca de 20% da referida soma; o teor de ácido láctico é cerca de 20% da referida soma; e o teor de ácido fosfórico é cerca de 30% da referida soma. Alternativamente, o teor de HMBA é desde cerca de 20% a cerca de 40% da referida soma do teor de ácido 2-hidroxi-4-(metiltio)butanóico, ácido butírico, ácido láctico e ácido fosfórico, o teor de ácido butírico é desde cerca de 5% a cerca de 25% da referida soma, o teor de ácido láctico é desde cerca de 10% a cerca de 30% da referida soma e o teor de ácido fosfórico é desde cerca de 25% a cerca de 45% da referida soma; com maior preferência, o teor de HMBA é cerca de 30% da referida soma, o teor de ácido butírico é cerca de 15% da referida soma, o teor de ácido láctico é cerca de 20% da referida soma e o teor de ácido fosfórico é cerca de 35% da referida soma.

Ainda numa outra concretização mais preferida, as composições e combinações aqui descritas compreendem HMBA, ácido butírico, ácido fórmico, ácido láctico e ácido fosfórico. De preferência, o teor de HMBA é desde cerca de 10% a cerca de 30% da soma do teor de HMBA, ácido butírico, ácido fórmico, ácido láctico e ácido fosfórico; o teor de ácido butírico é desde cerca de 2% a cerca de 22% da referida soma; o teor de ácido fórmico é desde cerca de 20% a cerca de 40% da referida soma; o teor de ácido láctico é desde cerca de 8% a cerca de 28% da referida soma; e o teor de ácido fosfórico é desde cerca de 10% a cerca de 30% da referida soma. Ainda com maior preferência, o teor de HMBA é cerca de 20% da referida soma; o teor de ácido butírico é cerca de 12% da referida soma; o teor de ácido fórmico é cerca de 30% da referida soma; o teor de ácido láctico é cerca de 18% da referida soma; e o teor de ácido fosfórico é cerca de 20% da referida soma.

Ainda noutra concretização mais preferida, as composições e combinações aqui descritas compreendem HMBA, ácido butírico, ácido láctico, ácido propiónico e ácido fosfórico. De preferência, o teor de HMBA é desde cerca de 10% a cerca de

30% da soma do teor de HMBA, ácido butírico, ácido láctico, ácido propiônico e ácido fosfórico; o teor de ácido butírico é desde cerca de 2% a cerca de 22% da referida soma; o teor de ácido láctico é desde cerca de 8% a cerca de 28% da referida soma; o teor de ácido propiônico é desde cerca de 20% a cerca de 40% da referida soma; e o teor de ácido fosfórico é desde cerca de 10% a cerca de 30% da referida soma. Ainda com maior preferência, o teor de HMBA é cerca de 20% da referida soma; o teor de ácido butírico é cerca de 12% da referida soma; o teor de ácido láctico é cerca de 18% da referida soma; o teor de ácido propiônico é cerca de 30% da referida soma; e o teor de ácido fosfórico é cerca de 20% da referida soma.

Ainda numa outra concretização mais preferida, as composições e combinações aqui descritas compreendem HMBA, ácido butírico, ácido fórmico, ácido propiônico e ácido fosfórico. De preferência, o teor de HMBA é desde cerca de 1% a cerca de 20% da soma do teor de HMBA, ácido butírico, ácido fórmico, ácido propiônico e ácido fosfórico; o teor de ácido butírico é desde cerca de 1% a cerca de 15% da referida soma; o teor de ácido fórmico é desde cerca de 65% a cerca de 85% da referida soma; o teor de ácido propiônico é desde cerca de 1% a cerca de 15% da referida soma; e o teor de ácido fosfórico é desde cerca de 1% a cerca de 15% da referida soma. Ainda com maior preferência, o teor de HMBA é cerca de 10% da referida soma; o teor de ácido butírico é cerca de 5% da referida soma; o teor de ácido fórmico é cerca de 75% da referida soma; o teor de ácido propiônico é cerca de 5% da referida soma; e o teor de ácido fosfórico é cerca de 5% da referida soma.

Ainda numa outra concretização mais preferida, as composições e combinações aqui descritas compreendem HMBA, ácido fórmico e ácido propiônico. De preferência, o teor de HMBA é desde cerca de 20% a cerca de 40% da soma do teor de HMBA, ácido fórmico e ácido propiônico; o teor de ácido fórmico é desde cerca de 40% a cerca de 60% da referida soma; e o teor de ácido propiônico é desde cerca de 10% a cerca de 30% da referida soma. Ainda com maior preferência, o teor de HMBA é cerca de 30% da referida soma; o teor de ácido fórmico é cerca de 50% da referida soma; e o teor de ácido propiônico é cerca de 20% da referida soma.

Os micróbios num elemento podem ser inibidos ou mortos por tratamento do referido elemento com uma composição ou combinação tal como aqui descrita. Numa concretização preferida, o elemento a ser tratado é água ou alimento, de preferência seleccionado de alimento para humanos, ração para gado, ração para animais de estimação ou ração para aquacultura.

Os animais aos quais se podem proporcionar os alimentos, ingredientes alimentares e/ou composições de ração aqui descritas incluem humanos, ruminantes tais como vacas leiteiras, vacas leiteiras em aleitamento, vitelas leiteiras, gado para produção de carne, ovelhas e cabras; aquacultura tais como peixes e crustáceos (incluindo, entre outros, salmão, camarão, carpa, tilápia e bivalves; gado tal como suíno e equino; aves de capoeira tais como galinhas, perus e seus pintos; e animais de estimação tais como cães e gatos.

A formulação exacta da composição de ração para animais mencionada anteriormente não é crítica para o presente invento. Os ingredientes da ração são seleccionados de acordo com as necessidades nutricionais do animal específico para o qual se pretende a ração; estas necessidades dependem, entre outros, da idade e estágio de desenvolvimento do animal, do sexo do animal e de outros factores. Os ingredientes da ração podem ser agrupados em oito classes com base na sua composição e na sua utilização na formulação de dietas: forragens secas e forragens carnudas; pasto, plantas e forragens frescas; silagens; rações energéticas; suplementos proteicos; suplementos minerais; suplementos vitamínicos; e aditivos. Consultar "National Research Council (U.S.) Subcommittee on Feed Composition", "United States-Canadian Tables of Feed Composition", 3<sup>a</sup> rev., National Academy Press, p. 2, 145 (1982). Em determinada extensão, estas classes são arbitrárias, dado que alguns ingredientes alimentares podem ser classificados em mais do que uma classe. Tipicamente, uma formulação de ração também dependerá dos custos associados a cada ingrediente, sendo a formulação preferida a composição de ingredientes menos dispendiosa que proporciona os nutrientes necessários.

A silagem é um produto de forragem que é produzido pela colheita, armazenagem e fermentação de colheitas de forragem verde, tais como plantas de milho e sorgo. Estas colheitas são cortadas, com caules e tudo, antes do grão estar pronto para colheita. O material da planta é armazenado em silos, sacos de armazenamento, caves ou fardos cobertos causando a fermentação do material e assim diminuindo o pH e conservando o material da planta até poder ser utilizado para alimentação. A forragem no silo é sujeita a alterações do pH, temperatura e níveis de oxigénio.

Tal como mencionado anteriormente, as formulações de ração dependem em parte da idade e estágio de desenvolvimento do animal a alimentar. Leeson e Summers (Nutrition of the Chicken, 4<sup>a</sup> ed., p. 502-510, University Books (2001)) descrevem várias dietas representativas de aves de capoeira para frangas, poedeiras, frangos e frangos de reprodução. Por exemplo, a maioria das dietas para galinhas contém concentrados energéticos tais como milho, aveia, trigo, cevada ou sorgo; fontes de proteína tais como farinha de soja, outras farinhas de oleaginosas (e.g., amendoim, sésamo, cártamo, girassol, etc.), farinha de semente de algodão, fontes de proteína animal (farinha de carne e osso, soro de leite seco, farinha de peixe, etc.), legumes em grão (e.g., feijões secos, ervilha forrageira, etc.) e alfafa; e suplementos vitamínicos e minerais, caso necessário (por exemplo, as farinhas de carne e osso têm níveis elevados de cálcio e fósforo e assim não é necessário adicionar estes minerais como suplemento de rações contendo farinhas de carne e osso). As quantidades relativas dos diferentes ingredientes em ração para aves de capoeira dependem em parte do estágio de produção da ave. As rações iniciais são mais ricas em proteína, enquanto as rações de crescimento e de abate podem ter teores mais baixos de proteína, dado que as aves mais velhas não necessitam de tanta proteína. Encontram-se também disponíveis dietas modelo para suínos e outros animais e podem ser modificadas de acordo com as necessidades específicas do(s) animal(is) a ser(em) alimentado(s).

A expressão "inibir" quando aqui utilizada em frases tais como "inibir bactérias" significa um ou mais de (a) matar bactérias ou bolor; (b) qualquer diminuição do crescimento de

bactérias ou bolor, que possa ser medida em termos de contagem de colónias; (c) qualquer diminuição da concentração de bactérias ou bolor; ou (d) incapacidade de bactérias ou bolor crescerem num meio de selecção específico. Cada um destes factores pode ser determinado, por exemplo, por comparação das contagens de colónias bacterianas ou fúngicas ou da concentração de bactérias ou bolor presentes na ausência da aplicação dos métodos aqui descritos com as contagens de colónias bacterianas ou fúngicas ou concentração de bactérias ou bolor após aplicação dos métodos do presente invento. A aplicação de bactericidas ou fungicidas adequados apresentará uma diferença de dez vezes na contagem de colónias.

Determinados métodos aqui descritos necessitam do cálculo, por exemplo, da concentração de um composto de Fórmula I numa ração para animais necessária para inibir bactérias ou bolor presentes numa ração para animais ou a concentração de um composto de Fórmula I e outro ácido ou ácidos orgânicos necessários para inibir bactérias ou bolor presentes numa ração para animais. Proporcionam-se aqui exemplos e exemplos comparativos 1-24, que ilustram as quantidades de composto de Fórmula I e/ou outros ácidos orgânicos que são suficientes para inibir bactérias ou bolor. Também se proporcionou aqui anteriormente e seguidamente gamas aceitáveis de composto de Fórmula I e/ou outros ácidos orgânicos e razões entre os dois, que são adequadas para utilização dos métodos do presente invento. Caso necessário, podem ser determinadas outras concentrações, gamas e razões adequadas.

A expressão "cfu" significa unidades formadoras de colónias.

Os seguintes exemplos ilustram o invento.

#### EXEMPLO comparativo 1

Estudaram-se os efeitos de quantidades crescentes de ácido fórmico e/ou Alimet® nas contagens de colónias de quatro bactérias (*E. coli*, *S. enteritidis*, *L. plantarum* e *C. jejuni*). Adicionaram-se individualmente quantidades variáveis de ácido fórmico ou Alimet® a culturas destas bactérias a pH 4,5 ou



6,75 e incubaram-se as culturas durante um intervalo de tempo, após o qual se efectuou contagem de colónias.

A cultura de *S. enteritidis* para o estudo *in vitro* continha uma mistura de *S. enteritidis* ID-Lelystad (estirpe resistente a ácido nalidíxico) e *S. enteritidis* (97.07773 RIVM, isolada de aves de capoeira). A cultura de *E. coli* continha uma mistura de *E. coli* O149K91K88 (VA2000-08915, patogénico do porco) e *E. coli* ATCC 25922. A cultura de *L. plantarum* estudada foi *L. plantarum* Bd 99.00553. A cultura de *C. jejuni* estudada foi *C. jejuni* C356, ex. ID-Lelystad.

Incubaram-se *S. enteritidis* e *E. coli* de culturas frescas durante a noite em meio de infusão de cérebro coração NaCl a 8,5 g/L) com peptona (1 g/L), excepto para *S. enteritidis* a pH 4,5. Para esta cultura utilizou-se meio 5 como meio de crescimento e incubou-se a cultura aerobicamente durante 4 horas a 37 °C. Efectuou-se contagem de colónias de acordo com os procedimentos de operação padrão.

A cultura fresca durante a noite de *L. plantarum* em meio de infusão cérebro coração foi utilizada para inocular meio 5. Incubaram-se tubos de ensaio em atmosfera de oxigénio reduzido durante 6 horas a 37 °C. Efectuou-se contagem de colónias.

Utilizou-se para inoculação *C. jejuni* cultivada em ágar-ágar selectivo isento de sangue de *Campylobacter*. Incubou-se meio de Preston em atmosfera de oxigénio reduzido durante 6 horas a 37 °C. Efectuou-se contagem de colónias.

Adicionou-se ácido fórmico e Alimet® às culturas bacterianas a concentrações de 0,108 g/L, 0,30 g/L e 0,83 g/L. Estas dosagens foram seleccionadas com base na utilização comercial de Alimet® e uma diluição de aproximadamente 10 vezes no tracto digestivo próximo.

Apresenta-se um resumo dos resultados obtidos com ácido fórmico e Alimet® em *S. enteritidis* e *E. coli* nas **tabelas 1 e 2** e em *L. plantarum* e *C. jejuni* nas **tabelas 3 e 4**; os resultados ilustram-se nas **figuras 1-4**.

| Tabela 1                                                                                             |         |            |       |            |       |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|-------|------------|-------|
| Efeito de ácido fórmico e Alimet® na população de <i>S. enteritidis</i> após 4 horas a pH 4,5 e 6,75 |         |            |       |            |       |
| Contagem de colónias inicial: 5,23 log cfu/mL                                                        |         |            |       |            |       |
| Ácido (g/L)                                                                                          |         | pH = 4,5   |       | pH = 6,75  |       |
| Alimet®                                                                                              | Fórmico | log cfu/mL | Δ log | log cfu/mL | Δ log |
| -                                                                                                    | -       | 5,03       | -0,20 | 6,62       | 1,42  |
| 0,108                                                                                                | -       | 4,92       | -0,31 | 6,71       | 1,51  |
| 0,30                                                                                                 | -       | 4,96       | -0,27 | 6,63       | 1,43  |
| 0,83                                                                                                 | -       | 4,93       | -0,30 | 6,53       | 1,33  |
| -                                                                                                    | 0,108   | 5,04       | -0,19 | 6,79       | 1,59  |
| -                                                                                                    | 0,30    | 4,96       | -0,27 | 6,77       | 1,57  |
| -                                                                                                    | 0,83    | 4,86       | -0,38 | 6,72       | 1,52  |

| Tabela 2                                                                                      |         |            |       |            |       |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|-------|------------|-------|
| Efeito de ácido fórmico e Alimet® na população de <i>E. coli</i> após 4 horas a pH 4,5 e 6,75 |         |            |       |            |       |
| Contagem de colónias inicial: 5,24 log cfu/mL                                                 |         |            |       |            |       |
| Ácido (g/L)                                                                                   |         | pH = 4,5   |       | pH = 6,75  |       |
| Alimet®                                                                                       | Fórmico | log cfu/mL | Δ log | log cfu/mL | Δ log |
| -                                                                                             | -       | 5,36       | 0,12  | 7,47       | 2,23  |
| 0,108                                                                                         | -       | 5,45       | 0,21  | 7,33       | 2,09  |
| 0,30                                                                                          | -       | 5,25       | 0,01  | 7,36       | 2,12  |
| 0,83                                                                                          | -       | 3,96       | -1,28 | 7,39       | 2,15  |
| -                                                                                             | 0,108   | 5,19       | -0,05 | 7,48       | 2,24  |
| -                                                                                             | 0,30    | 4,96       | -0,28 | 7,50       | 2,26  |
| -                                                                                             | 0,83    | 5,08       | -0,16 | 7,49       | 2,25  |

| Tabela 3                                                                                           |         |            |               |            |               |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|---------------|------------|---------------|
| Efeito de ácido fórmico e Alimet® na população de <i>L. plantarum</i> após 6 horas a pH 4,5 e 6,75 |         |            |               |            |               |
| Contagem de colónias inicial: 5,04 log cfu/mL $\Delta \log = \log_{amostra} - \log_{inicial}$      |         |            |               |            |               |
| Ácido (g/L)                                                                                        |         | pH = 4,5   |               | pH = 6,75  |               |
| Alimet®                                                                                            | Fórmico | log cfu/mL | $\Delta \log$ | log cfu/mL | $\Delta \log$ |
| -                                                                                                  | -       | 5,67       | 0,63          | 6,10       | 1,06          |
| 0,108                                                                                              | -       | 5,67       | 0,63          | 6,09       | 1,05          |
| 0,30                                                                                               | -       | 5,57       | 0,53          | 6,20       | 1,16          |
| 0,83                                                                                               | -       | 5,74       | 0,70          | 5,70       | 0,66          |
| -                                                                                                  | 0,108   | 5,75       | 0,71          | 5,88       | 0,84          |
| -                                                                                                  | 0,30    | 5,74       | 0,70          | 6,23       | 1,19          |
| -                                                                                                  | 0,83    | 5,56       | 0,52          | 6,19       | 1,15          |

| Tabela 4                                                                                        |         |            |               |            |               |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|---------------|------------|---------------|
| Efeito de ácido fórmico e Alimet® na população de <i>C. jejuni</i> após 6 horas a pH 4,5 e 6,75 |         |            |               |            |               |
| Contagem de colónias inicial: 5,23 log cfu/mL                                                   |         |            |               |            |               |
| Ácido (g/L)                                                                                     |         | pH = 4,5   |               | pH = 6,75  |               |
| Alimet®                                                                                         | Fórmico | log cfu/mL | $\Delta \log$ | log cfu/mL | $\Delta \log$ |
| -                                                                                               | -       | 3,70       | -1,53         | 6,54       | 1,31          |
| 0,108                                                                                           | -       | 0,108      | 4,07          | -1,16      | 6,44          |
| 0,30                                                                                            | -       | 0,30       | 3,95          | -1,28      | 6,40          |
| 0,83                                                                                            | -       | 0,83       | 2,80          | -2,43      | 6,34          |
| -                                                                                               | 0,108   | 3,86       | -1,37         | 6,27       | 1,04          |
| -                                                                                               | 0,30    | 2,63       | -2,60         | 6,38       | 1,15          |
| -                                                                                               | 0,83    | <1,30      | <-3,93        | 6,25       | 1,02          |

*S. enteritidis*: Antes da inoculação, as culturas de *S. enteritidis* apresentaram uma contagem de colónias de 5,03 log cfu/mL a pH 4,5 e de 6,62 a pH 6,75. Os resultados obtidos a ambos os valores de pH foram similares para Alimet® e ácido

fórmico: a pH 4,5, nenhum apresentou um efeito significativo na inibição de crescimento de *S. enteritidis*; a pH 6,75 não se observou qualquer inibição de *S. enteritidis*.

*E. coli*: Antes da inoculação a pH 4,5, as culturas de *E. coli* apresentaram uma contagem de colónias de 5,36 log cfu/mL; a pH 6,75 foi de 7,47. Alimet® a 0,83 g/L apresentou uma redução de aproximadamente 1,3 log no crescimento de *E. coli* a pH 4,5, comparativamente à redução de aproximadamente 0,1 log pela mesma concentração de ácido fórmico a pH 4,5. A concentrações inferiores tanto Alimet®, como o ácido fórmico apresentaram pouca ou nenhuma inibição. Nem Alimet®, nem o ácido fórmico inibiram *E. coli* a pH 6,75.

*L. plantarum*: Antes da inoculação, a pH 4,5, as culturas de *L. plantarum* apresentaram uma contagem de colónias de 5,67 log cfu/mL; a pH 6,75 foi de 6,10. Nem Alimet®, nem o ácido fórmico inibiram *L. plantarum* a qualquer dos valores de pH estudados.

*C. jejuni*: Antes da inoculação, a pH 4,5, as culturas de *C. jejuni* apresentaram uma contagem de colónias de 3,70 log cfu/mL; a pH 6,75 foi de 6,54. Todas as doses de Alimet® inibiram *C. jejuni* a pH 4,5. Alimet® 0,83 g/L provocou uma redução de aproximadamente 2,4 log do crescimento de *C. jejuni* a este pH. As dosagens inferiores de Alimet® (0,108 g/L e 0,30 g/L) provocaram uma redução de aproximadamente 1,1 e 1,2 log, respectivamente. O ácido fórmico demonstrou uma inibição comparável. Não se observou actividade antibacteriana contra *C. jejuni* a pH 6,75 para Alimet® ou para ácido fórmico a quaisquer das concentrações estudadas.

Estes resultados apresentam-se graficamente nas **figuras 1A, 1B, 1C e 1D**. As **figuras 2A, 2B, 2C e 2D** demonstram os efeitos dependentes de pH de ácido fórmico e Alimet®. Nenhuma das quatro bactérias estudadas foi inibida quer por ácido fórmico, quer por Alimet® a pH 6,75; de facto, a este pH, a contagem das unidades formadoras de colónias de cada bactéria aumentou, com a contagem de *E. coli* apresentando o maior aumento e a de *L. plantarum* apresentando o menor aumento.

EXEMPLO comparativo 2

Estudou-se o efeito de dosagens mais elevadas de Alimet® e ácido fórmico na contagem de colónias de culturas de *S. enteritidis*, seguindo o procedimento descrito no **exemplo 1**. Os resultados obtidos apresentam-se na **tabela 5** e ilustram-se na **figura 3**.

| Tabela 5                                                                                             |         |            |       |            |       |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|-------|------------|-------|
| Efeito de ácido fórmico e Alimet® na população de <i>S. enteritidis</i> após 4 horas a pH 4,5 e 6,75 |         |            |       |            |       |
| Contagem de colónias inicial: 5,23 log cfu/mL                                                        |         |            |       |            |       |
| Ácido (g/L)                                                                                          |         | pH = 4,5   |       | pH = 6,75  |       |
| Alimet®                                                                                              | Fórmico | log cfu/mL | Δ log | log cfu/mL | Δ log |
| -                                                                                                    | -       | 5,15       | -0,09 | 6,92       | 1,69  |
| 1                                                                                                    | -       | 5,02       | -0,21 | 6,61       | 1,38  |
| 3                                                                                                    | -       | 4,76       | -0,48 | 5,97       | 0,74  |
| 5                                                                                                    | -       | 2,37       | -2,86 | 5,43       | 0,20  |
| -                                                                                                    | 1       | 5,01       | -0,22 | 6,92       | 1,69  |
| -                                                                                                    | 3       | 4,55       | -0,68 | 6,58       | 1,35  |
| -                                                                                                    | 5       | 3,83       | -1,41 | 6,10       | 0,87  |

Antes da inoculação, as culturas de *S. enteritidis* apresentaram um valor de log cfu/mL de 5,15 a pH 4,5 e de 6,92 a pH 6,75. A pH 6,75, a adição de ácido fórmico a 5 g/L ou de Alimet® a 3 g/L provocou uma inibição de crescimento de aproximadamente 1 log cfu/mL. Uma adição de Alimet® a 5 g/L pára o crescimento de *S. enteritidis*. A pH 4,5, Alimet® a 5 g/L reduz o crescimento de *S. enteritidis* aproximadamente 2,8 log cfu/mL. As concentrações mais baixas de Alimet® provocam um efeito menor. O ácido fórmico a 5 g/L reduz o crescimento de *S. enteritidis* aproximadamente 1,3 log cfu/mL. Assim, na gama de doses estudada, o efeito antibacteriano de Alimet® contra *S. enteritidis* é superior ao do ácido fórmico. Estes resultados encontram-se demonstrados graficamente na **figura 3**.

EXEMPLO comparativo 3

Estudaram-se combinações de Alimet® e ácido fórmico, seguindo o procedimento descrito no **exemplo 1**. Os resultados obtidos apresentam-se na **tabela 6** e ilustram-se nas **figuras 4A** e **4B**.

| Tabela 6                                                                                             |         |            |       |            |       |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|-------|------------|-------|
| Efeito de ácido fórmico e Alimet® na população de <i>S. enteritidis</i> após 4 horas a pH 4,5 e 6,75 |         |            |       |            |       |
| Contagem de colónias inicial: 5,15 log cfu/mL)                                                       |         |            |       |            |       |
| Ácido (g/L)                                                                                          |         | pH = 4,5   |       | pH = 6,75  |       |
| Alimet®                                                                                              | Fórmico | log cfu/mL | Δ log | log cfu/mL | Δ log |
| -                                                                                                    | -       | 4,99       | -0,17 | 6,87       | 1,80  |
| 3                                                                                                    | -       | 4,76       | -0,39 | 5,89       | 0,82  |
| 5                                                                                                    | -       | 2,07       | -3,08 | 5,45       | 0,38  |
| -                                                                                                    | 3       | 4,57       | -0,58 | 6,51       | 1,44  |
| -                                                                                                    | 5       | 3,94       | -1,21 | 6,19       | 1,12  |
| 0,75                                                                                                 | 2,25    | 4,78       | -0,37 | 6,27       | 1,20  |
| 1,25                                                                                                 | 3,75    | 4,01       | -1,14 | 5,94       | 0,88  |
| 1,50                                                                                                 | 1,50    | 4,73       | -0,42 | 6,11       | 1,04  |
| 2,25                                                                                                 | 0,75    | 4,78       | -0,37 | 5,97       | 0,90  |
| 2,50                                                                                                 | 2,50    | 2,48       | -2,67 | 5,74       | 0,67  |
| 3                                                                                                    | 5       | 1,15       | -4,00 | 5,31       | 0,24  |
| 3,75                                                                                                 | 1,25    | 2,11       | -3,04 | 5,54       | 0,47  |

As combinações de Alimet® e ácido fórmico com uma concentração combinada de 5 g/L inibem o crescimento de *S. enteritidis* em maior extensão do que as combinações com uma concentração combinada de 3 g/L. Prepararam-se três combinações de 5 g/L, com razões Alimet®:ácido fórmico de 1:3, 1:1 e 3:1.

A pH 4,5, o tratamento apenas com Alimet® a 3 g/L provocou uma redução de aproximadamente 0,4 log cfu/mL do crescimento de *S. enteritidis*. O tratamento a esse pH com ácido fórmico a

5 g/L provocou uma redução de aproximadamente 1,2 log cfu/mL. Notavelmente, o tratamento com uma combinação de Alimet® a 3 g/L e ácido fórmico a 5 g/L provocou uma redução de 4 log cfu/mL, que foi superior ao esperado dado os resultados individuais com Alimet® e ácido fórmico a esses níveis. Os resultados obtidos sugerem que a pH 4,5, as combinações de Alimet® a 2,5 g/L e ácido fórmico a 2,5 g/L e de Alimet® a 3 g/L e ácido fórmico a 5 g/L podem ter um efeito de sinergia. Esta última combinação proporciona os melhores resultados de todas as combinações ensaiadas: a pH 4,5, esta combinação provoca uma redução de 4 log (quase completa) de *S. enteritidis*.

#### EXEMPLO comparativo 4

Estudaram-se os efeitos de misturas de ácidos orgânicos (butírico, cítrico, fórmico, láctico e propiônico) e Alimet® nas contagens de colónias de *E. coli* (ATCC 25922) cultivadas em meio de tripticase de soja a 35 °C de acordo com as instruções do fabricante. Estudaram-se mistura de ácido orgânico:Alimet® de 2:1 e 5:1, numa concentração total (ácido orgânico + Alimet®) de 6 g/L.

O pH das soluções foi ajustado originalmente a pH 5 por adição de HCl e/ou NaOH, tal como necessário. Transferiram-se soluções de cultura de *E. coli* activadas para duas vezes meio de soja fresco a intervalos de 24 horas antes da adição da mistura de ácido orgânico:Alimet®. Centrifugaram-se as soluções de cultura de *E. coli*; ressuspendeu-se o sedimento produzido em tampão Butterfield e as soluções resultantes foram diluídos a aproximadamente  $10^7$  CFU de *E. coli*/mL.

Inocularam-se frascos com 100 µL da suspensão bacteriana preparada e uma mistura de ácido orgânico:Alimet®. Retiraram-se amostras após cinco e 24 horas de incubação, diluíram-se em série e plaquearam-se por espalhamento em ágar-ágar de tripticase de soja e incubaram-se a 35 °C durante 24 horas. Apresentam-se as populações de *E. coli* na seguinte **tabela 7**.

| <b>Tabela 7</b>                                                                                   |                     |             |            |       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|-------------|------------|-------|
| Efeito de misturas de Alimet®/ácido em populações de <i>E. coli</i> em meio de tripticase de soja |                     |             |            |       |
| Contagem de colónias inicial: 4,97 log cfu/mL                                                     |                     |             |            |       |
| Ácido                                                                                             | Razão ácido:Alimet® | pH original | log cfu/mL |       |
|                                                                                                   |                     |             | t=4h       | t=24h |
| Controlo                                                                                          | -                   | -           | 7,18       | 9,22  |
| HCl                                                                                               | -                   | -           | 7,85       | 8,34  |
| lático                                                                                            | 5:1                 | ~ 4,2       | 4,68       | 3,98  |
|                                                                                                   | 2:1                 | 4,1         | 4,87       | 4,45  |
| fórmico                                                                                           | 5:1                 | 3,1         | 4,95       | <1    |
|                                                                                                   | 2:1                 | 3,56        | 4,95       | 1,00  |
| cítrico                                                                                           | 5:1                 | 4,75        | 6,38       | 8,59  |
|                                                                                                   | 2:1                 | 4,59        | 5,90       | 8,66  |
| butírico                                                                                          | 5:1                 | 4,62        | 4,77       | 3,70  |
|                                                                                                   | 2:1                 | 4,6         | 4,85       | 3,80  |
| propiónico                                                                                        | 5:1                 | 4,54        | 4,79       | 4,57  |
|                                                                                                   | 2:1                 | 4,53        | 4,83       | 4,53  |

As misturas com ácido fórmico foram as mais eficazes entre as misturas ensaiadas para controlar *E. coli* em ambas as misturas de ácido fórmico:Alimet® 5:1 e 2:1. Após exposição prolongada (após 5 horas), ambos as razões provocaram redução quase completa de *E. coli*. As misturas de ácidos láctico, butírico e propiónico com Alimet® suprimiram o crescimento de *E. coli*, mas não reduziram a população bacteriana em 24 horas.

#### EXEMPLO comparativo 5

Estudaram-se os efeitos de ácido clorídrico, ácido fórmico, ácido láctico ou Alimet® nas contagens de colónias de *E. coli*. Adicionaram-se quantidades de ácido fórmico, ácido láctico ou Alimet® a culturas de *E. coli*, cultivaram-se num meio de soja, a pH 4 ou 7,3. Incubaram-se as culturas e efectuaram-se contagens de colónias a tempos crescentes.



Os resultados estão ilustrados na **figura 5**. O ácido fórmico e ácido láctico e Alimet® diminuíram as contagens de colónias de *E. coli* melhor do que o ácido clorídrico. Tal como no **exemplo 1**, Alimet® apresentou uma melhor redução das contagens de colónias de *E. coli* comparativamente ao ácido fórmico e apresentou uma redução comparável a ácido láctico.

#### EXEMPLO comparativo 6

Estudou-se o efeito de Alimet® em *Salmonella* numa pré-mistura de farinha de carne, de acordo com o protocolo estabelecido por Smyser e Snoeyenbos (Poultry Sci. 58 (1979) 50-54). Utilizou-se pré-mistura de farinha de carne (Papillon Ag Products, Inc., Easton, MD) contendo aproximadamente 77% de proteína em bruto nos ensaios. Mediu-se dez gramas de amostra de ensaio de pré-mistura para cada concentração de Alimet® estudada para um tubo estéril (três réplicas por amostra). Adicionou-se água estéril (1 mL) a cada tubo para assegurar humidade adequada para multiplicação de salmonela. Após inoculação atingiu-se um nível de humidade final de 20%. Inoculou-se cada amostra de ensaio com 1,0 mL de cultura em meio TBS diluído de *Salmonella* resistente a ácido nalidíxico (NA) (aproximadamente  $10^{3,5}$  células/g tal como determinado a partir das contagens de placas por espalhamento da cultura). Misturaram-se as amostras inoculadas com uma espátula estéril ou ferramenta equivalente e incubaram-se a 37 °C durante todo o ensaio.

Determinaram-se as contagens de *Salmonella* utilizando ágar-ágar com verde brilhante contendo nalidixato de sódio nos dias 1, 2 e 3. Retirou-se uma amostra de ensaio de 1 g de cada tubo e transferiu-se para 9 mL de água estéril. Esta amostra de ensaio foi incubada a 4 °C durante aproximadamente 4 horas, seguidamente agitou-se durante 60-90 segundos. Cada amostra de ensaio foi diluída em série em proporções de 1:10, 1:100 e 1:1000 e plaquearam-se 100 µL da amostra de ensaio não diluída, da amostra diluída 1:10, da amostra diluída 1:100 e da amostra diluída 1:1000 em placas de ágar-ágar com verde brilhante contendo nalidixato de sódio. A percentagem de recuperação de *Salmonella* para diferentes níveis de Alimet® apresenta-se na **tabela 8** e **figura 7**.

| Tabela 8                                                                                               |                                 |                                    |       |       |       |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|-------|-------|-------|
| Recuperação de <i>Salmonella</i> em pré-mistura de farinha de carne com 20% de humidade; diluição 1:10 |                                 |                                    |       |       |       |
| Alimet® conc.<br>(relatado)                                                                            | Alimet® conc.<br>(experimental) | % recuperação de <i>Salmonella</i> |       |       |       |
|                                                                                                        |                                 | dia 0                              | dia 1 | dia 2 | dia 3 |
| Controlo (0%)                                                                                          |                                 | 100%                               | 1990% | 971%  | 267%  |
| 0,275%                                                                                                 | 0,056%                          | 100%                               | 102%  | 67%   | <3%*  |
| 0,18%                                                                                                  | 0,140%                          | 100%                               | 190%  | 65%   | 11%   |
| 0,25%                                                                                                  | 0,188%                          | 100%                               | 476%  | 139%  | 25%   |
| 0,36%                                                                                                  | 0,192%                          | 100%                               | 114 % | 62%   | 4%    |
| 0,40%                                                                                                  | 0,220%                          | 100%                               | 343%  | 267%  | 53%   |
| 0,69%                                                                                                  | 0,631%                          | 100%                               | 5%    | <3%*  | <3%*  |
| * inferior ao limite de detecção                                                                       |                                 |                                    |       |       |       |

A amostra de controlo (sem adição de Alimet®) apresentou um aumento drástico inicial na população de salmonela um dia após inoculação, indicando multiplicação das bactérias. Esta multiplicação foi seguida por um declínio gradual das contagens bacterianas nos dias 2 e 3. Os resultados do nível mais elevado de Alimet® ensaiado sugerem que Alimet® é bactericida para *Salmonella* em farinha de carne e osso. Tal como ilustrado na **figura 8**, Alimet® a este nível apresenta resultados comparáveis ao tratamento com ácido fórmico a 1,65% (15 kg/tonelada). Consultar Liu, "Using organic acids to Control Salmonella in Poultry Production", Kemin Industries (Asia) Pte Limited, Singapura, disponível em <http://www.kemin.com>.

De igual modo, Alimet® na gama de 0,14-0,22% apresentou efeitos anti-*Salmonella* e não parecem ser dependentes da dose nesta gama. No entanto, cada amostra foi obtida de diferentes lotes de farinha de carne e osso, o que pode ser responsável pela falta de dependência entre a resposta e a dose. A multiplicação inicial verificada no controlo foi reduzida significativamente por adição de Alimet® a estes níveis. O

declínio subsequente foi mais rápido para estes níveis baixos de Alimet® comparativamente ao controlo.

#### EXEMPLO comparativo 7

Estudou-se o crescimento fúngico em misturas basais para pintos em composições suplementadas com DLM ou Alimet® como fonte de metionina. O crescimento microbiano total foi monitorizado por medição da formação de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) em frascos selados a 28 °C ao longo do tempo. A medição da formação de CO<sub>2</sub> não distingue entre crescimento de bactérias e de bolor; no entanto, é bem conhecida a capacidade do bolor crescer a actividades de água bastante mais baixas do que as bactérias e tanto o bolor como as bactérias desempenham um papel na degradação de ração.

Verificou-se que a técnica de utilizar um sistema fechado e medir a formação de CO<sub>2</sub> é uma aproximação das condições encontradas em contentores de armazenamento de grão. Consultar, e.g., Muir et al., Trans. ASAE, 28(5) 1673-1675 (1985), cujo conteúdo se incorpora aqui por referência na sua globalidade.

Subdividiu-se uma formulação de ração de mistura para pintos (formulação apresentada na seguinte **tabela 9**) em três grupos: basal (controlo), DLM a 0,2% ou Alimet® a 0,2%. A ração estudada não tinha quaisquer inibidores de bolor comerciais e é representativa de uma típica ração para engorda.

A humidade inicial da ração foi de 10,8%. Após a adição de Alimet® ou DLM, ajustou-se a humidade das amostras por adição de água destilada estéril a 2%, 4% ou 6% para promover o crescimento de fungos, conseguindo três grupos de humidade: 83,2% de matéria seca/12,8% de humidade; 85,2% de matéria seca/14,8% de humidade; e 87,2% de matéria seca/16,8% de humidade.

Para cada estudo, misturaram-se quatro amostras réplicas de cada grupo de humidade e colocou-se 600 g da mistura em recipientes de 1 L, selaram-se e colocaram-se a 28 °C numa sala com temperatura controlada. Utilizaram-se tubos de

detector Draeger (medição de CO<sub>2</sub>, obtidos de Fisher Scientific) para medir o CO<sub>2</sub> libertado em dias diferentes após selar o frasco (fizeram-se duas medições por semana). Os tubos de detector a curto prazo Draeger são tubos de vidro cheios com um transportador inerte e um reagente indicador. O reagente produz uma indicação colorimétrica da presença de um determinado gás (CO<sub>2</sub>). A concentração de gás é medida directamente pela descoloração da escala impressa no tubo.

Não se identificou a espécie de bolor específica presente. Efectuou-se análise estatística utilizando o ensaio de gama múltipla de Duncan (SAS). As diferentes letras nos pontos temporais individuais nas **figuras 9-11** indicam diferenças estatísticas de  $P < 0,05$ .

| <b>Tabela 9</b>                                                                               |                                    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Formulação de mistura basal para pintos                                                       |                                    |
| <b>Ingrediente</b>                                                                            | <b>% por peso da mistura total</b> |
| Milho                                                                                         | 60,551                             |
| Farinha de soja                                                                               | 32,254                             |
| Gordura, animal                                                                               | 3,665                              |
| Dical940224PhosfromD (fosfato de dicálcio)                                                    | 1,861                              |
| Calcário                                                                                      | 0,811                              |
| Pré-mistura vitamina/mineral Novus fabricada por Trouw Nutrition (Highland, Illinois)         | 0,350                              |
| Sal                                                                                           | 0,340                              |
| L-lisina HCl 78%                                                                              | 0,097                              |
| Treonina                                                                                      | 0,051                              |
| Santoquin-mix6 Conservante antioxidante comercializado por Solutia Inc. (St. Louis, Missouri) | 0,019                              |
| Sulfato de cobre                                                                              | 0,003                              |

Tal como apresentado na **figura 9**, Alimet<sup>®</sup> inibiu eficazmente o crescimento de bolor durante até sete dias ao

nível mais elevado de humidade ensaiado (83,2% de matéria seca/16,8% de humidade), enquanto DLM foi o menos eficaz e, de facto, apresentou crescimento de bolor no intervalo de dois dias. De facto, a mistura para pintos tratada com DLM apresentou um crescimento de bolor mais rápido do que a mistura basal (i.e., ração sem adição de metionina ou análogo de metionina) e mais rápido do que a mistura tratada com Alimet<sup>®</sup>, para todos os níveis de humidade ensaiados.

Tal como demonstrado na **figura 10**, a ração tratada com Alimet<sup>®</sup> apresentou uma velocidade de crescimento de bolor mais baixa em mistura com 85,2% de matéria seca/14,8% de humidade do que a ração tratada com DLM.

Para ração com 87,2% de matéria seca/12,8% de humidade, a ração tratada com Alimet<sup>®</sup> apresenta níveis baixos de bolor até aos sessenta dias, enquanto a ração tratada com DLM apresenta um aumento drástico do crescimento de bolor após apenas vinte dias (consultar **figura 11**).

As **figuras 9, 10 e 11** ilustram que a mistura tratada com DLM tem mais tendência a desenvolver bolor do que qualquer das rações deficientes em metionina ou ração tratada com Alimet<sup>®</sup> e que Alimet<sup>®</sup> foi mais eficaz a inibir o crescimento de bolor comparativamente a ração não tratada ou ração suplementada com DLM.

#### EXEMPLO comparativo 8

Repetiu-se a experiência descrita anteriormente no **exemplo 7** com misturas de 2,0 libras/tonelada, 1,5 libras/tonelada, 1,0 libras/tonelada ou 0,5 libras/tonelada de ácido propiónico a 65% e Alimet<sup>®</sup> a 2% ou DLM a 2%. Prepararam-se as misturas de acordo com a matriz apresentada na seguinte **tabela 8**. O ácido propiónico a 65% foi tamponado com amoníaco a pH 5,5.

| Tabela 10                                                    |             |                             |         |
|--------------------------------------------------------------|-------------|-----------------------------|---------|
| Misturas antifúngicas de Alimet® ou DLM com ácido propiónico |             |                             |         |
| Ensaio N°                                                    | Alimet® (%) | Propiónico (libra/tonelada) | DLM (%) |
| 1                                                            | 0,2         | -                           | -       |
| 2                                                            | -           | 2                           | 0,2     |
| 3                                                            | -           | 1,5                         | 0,2     |
| 4                                                            | -           | 1,0                         | 0,2     |
| 5                                                            | -           | 0,5                         | 0,2     |
| 6                                                            | -           | -                           | 0,2     |
| 7                                                            | 0,2         | 2                           | -       |
| 8                                                            | 0,2         | 1,5                         | -       |
| 9                                                            | 0,2         | 1,0                         | -       |
| 10                                                           | 0,2         | 0,5                         | -       |

Efectuou-se análise estatística utilizando o ensaio de gama múltipla de Duncan (SAS). As diferentes letras nos pontos temporais individuais indicam diferenças estatísticas de  $P < 0,05$ .

Tal como apresentado na **figura 12**, a dieta de base com 85,2% de matéria seca e contendo Alimet® a 0,2% atrasou 5 dias o início de desenvolvimento de bolor; o efeito de ácido propiónico a 65% a 2,0 libras/tonelada, 1,5 libras/tonelada e 1,0 libras/tonelada é cerca de 11 dias, i.e., não se verifica qualquer diferença significativa quando se adiciona ácido propiónico a mais de 1 libra/tonelada.

As combinações de Alimet® e ácido propiónico foram comparadas com ração tratada apenas com ácido propiónico e os resultados apresentam-se nas **figuras 13-15**. Os resultados indicam que, para todas os níveis de humidade estudados, a ração basal contendo Alimet® e ácido propiónico apresentou uma inibição de bolor melhorada comparativamente a ração contendo apenas ácido propiónico.

EXEMPLO comparativo 9

Estudou-se o efeito dos ácidos fórmico, butírico e láctico em populações de *Salmonella* em ração para pintos de engorda com base de milho e soja basal para determinar os níveis destes ácidos necessários para capacidade bactericida completa.

Efectuaram-se ensaios utilizando 1 g de ração (granulado moído) com farinha de carne e osso a 6% ("MBM"). Prepararam-se soluções aquosas a 25% de ácido fórmico, de ácido butírico e de ácido láctico. Adicionaram-se as soluções de ácido à ração tal como indicado seguidamente; adicionou-se água (1 mL) e HCl 150 mM (1,8 mL) para ajustar o pH a 4,0. Adicionou-se *Salmonella* resistente a ácido nalidíxico (proporcionada pelo Dr. Stan Bailey, USDA/ARS, Athens, Georgia) (contagem de colónias inicial = 40 000 cfu/g) e incubaram-se as soluções de ração a 37 °C durante 90 min. Diluiu-se cada amostra com 6 mL de H<sub>2</sub>O, plaqueou-se e contaram-se no dia seguinte. As contagens de colónias apresentam-se seguidamente na **tabela 11**.

| Tabela 11                                                                                                                                                    |     |           |          |           |               |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----------|----------|-----------|---------------|
| Efeito de ácidos fórmico, butírico ou láctico em populações de <i>Salmonella</i> em ração [ $\Delta \log = \log_{\text{amostra}} - \log_{\text{controlo}}$ ] |     |           |          |           |               |
| Ácido                                                                                                                                                        | g/L | vol. (µL) | pH final | log cfu/g | $\Delta \log$ |
| controlo                                                                                                                                                     |     |           | 4,47     | 5,0       | -             |
| fórmico                                                                                                                                                      | 2,5 | 10        | 4,28     | 4,3       | 0,7           |
|                                                                                                                                                              | 5,0 | 20        | 4,18     | 3,6       | 1,4           |
|                                                                                                                                                              | 7,5 | 30        | 4,1      | 1,0       | 4,0           |
|                                                                                                                                                              | 10  | 40        | 4        | 1,0       | 4,0           |
| butírico                                                                                                                                                     | 10  | 40        | 4,31     | 4,3       | 0,7           |
|                                                                                                                                                              | 30  | 120       | 4,17     | 1,0       | 4,0           |
|                                                                                                                                                              | 50  | 200       | 4,04     | 1,0       | 4,0           |
| láctico                                                                                                                                                      | 10  | 40        | 4,2      | 4,1       | 0,9           |
|                                                                                                                                                              | 30  | 120       | 3,92     | 1,0       | 4,0           |
|                                                                                                                                                              | 50  | 200       | 3,68     | 1,0       | 4,0           |
| controlo                                                                                                                                                     |     |           | 4,44     |           |               |

Verificou-se actividade bactericida completa às duas doses mais elevadas ensaiadas para os três ácidos (7,5 e 10 g/L para ácido fórmico; 30 e 50 g/L para ácidos butírico e láctico).

#### EXEMPLO 10

Seguindo o procedimento apresentado no **exemplo 9**, estudou-se o efeito de misturas de ácidos fórmico, butírico e/ou láctico, com e sem Alimet®, em contagens de *Salmonella* em ração para pintos de engorda baseada em milho e soja basal (descrita na **tabela 9**, anterior, granulado moído com MBM a 6%). As misturas estudadas estão descritas na **tabela 12** e os resultados obtidos no estudo in vitro apresentam-se nas **tabelas 13-15**.

| <b>Tabela 12</b>                                                   |                      |                      |                       |                |
|--------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------|
| Formulações de misturas de ácidos (concentrações relatadas em g/L) |                      |                      |                       |                |
| <b>Mistura</b>                                                     | <b>Ácido fórmico</b> | <b>Ácido láctico</b> | <b>Ácido butírico</b> | <b>Alimet®</b> |
| A1                                                                 | 5                    | –                    | –                     | –              |
| A2                                                                 | 4                    | 4                    | –                     | –              |
| A3                                                                 | 4                    | –                    | 4                     | –              |
| A4                                                                 | 3                    | –                    | 8                     | –              |
| A5                                                                 | 3                    | 4                    | 4                     | –              |
| A6                                                                 | 3                    | 8                    | –                     | –              |
| A7                                                                 | 2                    | –                    | 12                    | –              |
| A8                                                                 | 2                    | 4                    | 8                     | –              |
| A9                                                                 | 2                    | 8                    | 4                     | –              |
| A10                                                                | 2                    | 12                   | –                     | –              |
| A11                                                                | 1                    | –                    | 16                    | –              |
| A12                                                                | 1                    | 4                    | 12                    | –              |
| A13                                                                | 1                    | 8                    | 8                     | –              |
| A14                                                                | 1                    | 12                   | 4                     | –              |
| A15                                                                | 1                    | 16                   | –                     | –              |
| A16                                                                | –                    | –                    | 20                    | –              |



| <b>Tabela 12</b>                                                   |                      |                      |                       |                |
|--------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------|
| Formulações de misturas de ácidos (concentrações relatadas em g/L) |                      |                      |                       |                |
| <b>Mistura</b>                                                     | <b>Ácido fórmico</b> | <b>Ácido láctico</b> | <b>Ácido butírico</b> | <b>Alimet®</b> |
| A17                                                                | –                    | 4                    | 16                    | –              |
| A18                                                                | –                    | 8                    | 12                    | –              |
| A19                                                                | –                    | 12                   | 8                     | –              |
| A20                                                                | –                    | 16                   | 4                     | –              |
| A21                                                                | –                    | 20                   | –                     | –              |
| A22                                                                | 5                    | –                    | –                     | 1              |
| A23                                                                | 4                    | 4                    | –                     | 1              |
| A24                                                                | 4                    | –                    | 4                     | 1              |
| A25                                                                | 3                    | –                    | 8                     | 1              |
| A26                                                                | 3                    | 4                    | 4                     | 1              |
| A27                                                                | 3                    | 8                    | –                     | 1              |
| A28                                                                | 2                    | –                    | 12                    | 1              |
| A29                                                                | 2                    | 4                    | 8                     | 1              |
| A30                                                                | 2                    | 8                    | 4                     | 1              |
| A31                                                                | 2                    | 12                   | –                     | 1              |
| A32                                                                | 1                    | –                    | 16                    | 1              |
| A33                                                                | 1                    | 4                    | 12                    | 1              |
| A34                                                                | 1                    | 8                    | 8                     | 1              |
| A35                                                                | 1                    | 12                   | 4                     | 1              |
| A36                                                                | 1                    | 16                   | –                     | 1              |
| A37                                                                | –                    | –                    | 20                    | 1              |
| A38                                                                | –                    | 4                    | 16                    | 1              |
| A39                                                                | –                    | 8                    | 12                    | 1              |
| A40                                                                | –                    | 12                   | 8                     | 1              |
| A41                                                                | –                    | 16                   | 4                     | 1              |
| A42                                                                | –                    | 20                   | –                     | 1              |
| A43                                                                | 5                    | –                    | –                     | 2,27           |
| A44                                                                | 4                    | 4                    | –                     | 2,27           |

| <b>Tabela 12</b>                                                   |                      |                      |                       |                |
|--------------------------------------------------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------|
| Formulações de misturas de ácidos (concentrações relatadas em g/L) |                      |                      |                       |                |
| <b>Mistura</b>                                                     | <b>Ácido fórmico</b> | <b>Ácido láctico</b> | <b>Ácido butírico</b> | <b>Alimet®</b> |
| A45                                                                | 4                    | –                    | 4                     | 2,27           |
| A46                                                                | 3                    | –                    | 8                     | 2,27           |
| A47                                                                | 3                    | 4                    | 4                     | 2,27           |
| A48                                                                | 3                    | 8                    | –                     | 2,27           |
| A49                                                                | 2                    | –                    | 12                    | 2,27           |
| A50                                                                | 2                    | 4                    | 8                     | 2,27           |
| A51                                                                | 2                    | 8                    | 4                     | 2,27           |
| A52                                                                | 2                    | 12                   | –                     | 2,27           |
| A53                                                                | 1                    | –                    | 16                    | 2,27           |
| A54                                                                | 1                    | 4                    | 12                    | 2,27           |
| A55                                                                | 1                    | 8                    | 8                     | 2,27           |
| A56                                                                | 1                    | 12                   | 4                     | 2,27           |
| A57                                                                | 1                    | 16                   | –                     | 2,27           |
| A58                                                                | –                    | –                    | 20                    | 2,27           |
| A59                                                                | –                    | 4                    | 16                    | 2,27           |
| A60                                                                | –                    | 8                    | 12                    | 2,27           |
| A61                                                                | –                    | 12                   | 8                     | 2,27           |
| A62                                                                | –                    | 16                   | 4                     | 2,27           |
| A63                                                                | –                    | 20                   | –                     | 2,27           |

| Tabela 13                                                                                           |          |           |                         |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-----------|-------------------------|
| Efeito de misturas fórmico/butírico/láctico sem Alimet® em populações de <i>Salmonella</i> em ração |          |           |                         |
| Mistura                                                                                             | pH final | log cfu/g | $\Delta$ log de redução |
| A1                                                                                                  | 4,12     | 3,1       | 1,6                     |
| A2                                                                                                  | 4,13     | 2,9       | 1,8                     |
| A3                                                                                                  | 4,18     | 3,1       | 1,6                     |
| A4                                                                                                  | 4,18     | 3,0       | 1,7                     |
| A5                                                                                                  | 4,18     | 3,2       | 1,5                     |
| A6                                                                                                  | 4,15     | 2,6       | 2,1                     |
| A7                                                                                                  | 4,15     | 2,8       | 1,9                     |
| A8                                                                                                  | 4,18     | 2,8       | 1,9                     |
| A9                                                                                                  | 4,16     | 2,5       | 2,2                     |
| A10                                                                                                 | 4,12     | 1,8       | 2,9                     |
| A11                                                                                                 | 4,16     | 2,7       | 2,0                     |
| A12                                                                                                 | 4,17     | 2,7       | 2,0                     |
| A13                                                                                                 | 4,16     | 2,8       | 1,9                     |
| A14                                                                                                 | 4,14     | 2,9       | 1,8                     |
| A15                                                                                                 | 4,1      | 2,6       | 2,1                     |
| A16                                                                                                 | 4,16     | 2,7       | 2,0                     |
| A17                                                                                                 | 4,21     | 2,7       | 2,0                     |
| A18                                                                                                 | 4,18     | 2,5       | 2,2                     |
| A19                                                                                                 | 4,16     | 1,7       | 3,0                     |
| A20                                                                                                 | 4,13     | 2,7       | 2,0                     |
| A21                                                                                                 | 4,05     | 1,8       | 2,9                     |
| controlo                                                                                            | 4,33     | 4,7       | –                       |

| <b>Tabela 14</b>                                                                                                      |                 |                  |                         |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|------------------|-------------------------|
| Efeito de misturas fórmico/butírico/láctico com adição de Alimet® a 1 g/L em populações de <i>Salmonella</i> em ração |                 |                  |                         |
| <b>Mistura</b>                                                                                                        | <b>pH final</b> | <b>log cfu/g</b> | <b>Δ log de redução</b> |
| A22                                                                                                                   | 4,09            | 3,5              | 1,0                     |
| A23                                                                                                                   | 4,09            | 2,1              | 2,4                     |
| A24                                                                                                                   | 4,09            | 2,9              | 1,6                     |
| A25                                                                                                                   | 4,12            | 2,2              | 2,3                     |
| A26                                                                                                                   | 4,11            | 2,3              | 2,2                     |
| A27                                                                                                                   | 4,1             | 1,9              | 2,6                     |
| A28                                                                                                                   | 4,11            | 2,3              | 2,2                     |
| A29                                                                                                                   | 4,14            | 2,3              | 2,2                     |
| A30                                                                                                                   | 4,1             | 1,9              | 2,6                     |
| A31                                                                                                                   | 4,06            | 1,6              | 2,9                     |
| A32                                                                                                                   | 4,15            | 2,4              | 2,1                     |
| A33                                                                                                                   | 4,15            | 2,3              | 2,2                     |
| A34                                                                                                                   | 4,15            | 1,4              | 3,1                     |
| A35                                                                                                                   | 4,11            | 1,7              | 2,8                     |
| A36                                                                                                                   | 4,06            | 1,8              | 2,7                     |
| A37                                                                                                                   | 4,13            | 2,0              | 2,5                     |
| A38                                                                                                                   | 4,16            | 2,0              | 2,5                     |
| A39                                                                                                                   | 4,13            | 1,8              | 2,7                     |
| A40                                                                                                                   | 4,12            | 1,8              | 2,7                     |
| A41                                                                                                                   | 4,08            | 1,7              | 2,8                     |
| A42                                                                                                                   | 4,06            | 1,7              | 2,8                     |
| controlo                                                                                                              | 4,33            | 4,7              | 0,2                     |
| controlo                                                                                                              | 4,36            | 4,5              | -                       |

| Tabela 15                                                                                                                |          |           |                  |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-----------|------------------|
| Efeito de misturas fórmico/butírico/láctico com adição de Alimet® a 2,27 g/L em populações de <i>Salmonella</i> em ração |          |           |                  |
| Mistura                                                                                                                  | pH final | log cfu/g | Δ log de redução |
| A43                                                                                                                      | 4,21     | 2,8       | 0,7              |
| A44                                                                                                                      | 4,17     | 2,8       | 0,7              |
| A45                                                                                                                      | 4,18     | 3,0       | 0,5              |
| A46                                                                                                                      | 4,18     | 2,8       | 0,7              |
| A47                                                                                                                      | 4,15     | 3,7       | -0,2             |
| A48                                                                                                                      | 4,11     | 2,0       | 1,5              |
| A49                                                                                                                      | 4,19     | 2,7       | 0,8              |
| A50                                                                                                                      | 4,19     | 2,8       | 0,7              |
| A51                                                                                                                      | 4,16     | 2,8       | 0,7              |
| A52                                                                                                                      | 4,13     | 2,4       | 1,1              |
| A53                                                                                                                      | 4,2      | 2,8       | 0,7              |
| A54                                                                                                                      | 4,2      | 2,7       | 0,8              |
| A55                                                                                                                      | 4,14     | 2,3       | 1,2              |
| A56                                                                                                                      | 4,13     | 1,7       | 1,8              |
| A57                                                                                                                      | 4,08     | 1,0       | 2,5              |
| A58                                                                                                                      | 4,21     | 2,3       | 1,2              |
| A59                                                                                                                      | 4,23     | 2,7       | 0,8              |
| A60                                                                                                                      | 4,17     | 2,0       | 1,5              |
| A61                                                                                                                      | 4,14     | 2,0       | 1,5 5            |
| A62                                                                                                                      | 4,12     | 0,7       | 2,8              |
| A63                                                                                                                      | 4,07     | 0,7       | 2,8              |
| controlo                                                                                                                 | 4,37     | 3,5       | 0                |
| controlo                                                                                                                 | 4,45     | 3,5       | -                |

A adição de Alimet® a 1 g/L à mistura proporcionou resultados melhorados nas dezasseis misturas ensaiadas.

As formulações das misturas utilizadas nos **exemplos 11-13** apresentam-se na **tabela 16**.

| <b>Tabela 16</b>                                  |         |                   |          |         |         |                    |
|---------------------------------------------------|---------|-------------------|----------|---------|---------|--------------------|
| Formulações de misturas de ácido orgânico/Alimet® |         |                   |          |         |         |                    |
| Mistura                                           | Alimet® | Fos. <sup>1</sup> | Butírico | Fórmico | Láctico | Prop. <sup>2</sup> |
| A64                                               | 30      | 30                | 20       | -       | 20      | -                  |
| A65                                               | 30      | -                 | -        | 50      | -       | 20                 |
| A66                                               | 20      | 20                | 12       | 30      | 18      | -                  |
| A67                                               | 10      | 10                | -        | 75      | -       | 5                  |
| A68                                               | 30      | 35                | 15       | -       | 20      | -                  |
| A69                                               | 30      | 5                 | -        | 55      | -       | 10                 |
| A70                                               | 20      | 20                | 12       | -       | 18      | 30                 |
| A71                                               | 10      | 5                 | 5        | 75      | -       | 5                  |
| A72                                               | -       | -                 | -        | 50      | -       | 50                 |
| A73                                               | -       | -                 | -        | 75      | -       | 25                 |
| <sup>1</sup> Ácido fosfórico                      |         |                   |          |         |         |                    |
| <sup>2</sup> Ácido propiónico                     |         |                   |          |         |         |                    |

#### EXEMPLO 11

Estudaram-se os efeitos das misturas de ácidos orgânicos sobre as contagens de colónias de salmonela numa dieta baseada em milho e soja tal como estabelecida na **Tabela 9**, anteriormente, (DLM a 0,2%), seguindo o procedimento descrito na generalidade no **Exemplo 9**. Reportam-se os resultados na **Tabela 17**.

| Tabela 17                                                                                            |      |                      |           |               |          |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|----------------------|-----------|---------------|----------|
| Efeito de misturas de ácidos sobre a população de <i>Salmonella</i> em dieta baseada em milho e soja |      |                      |           |               |          |
| Mistura                                                                                              | g/kg | após 60 min.         |           |               |          |
|                                                                                                      |      | cfu/g <sup>1,2</sup> | log cfu/g | Δ log redução |          |
| controlo                                                                                             |      | 40 000               | 4,6       | -             |          |
| A64                                                                                                  | 5    | 29 700               | 4,5       | 0,1           |          |
|                                                                                                      | 10   | 2 300                | 3,4       | 1,2           |          |
| A65                                                                                                  | 5    | 3 100                | 3,5       | 1,1           |          |
|                                                                                                      | 10   | 40                   | 1,6       | 3,0           |          |
| A66                                                                                                  | 5    | 10 000               | 4,0       | 0,6           |          |
|                                                                                                      | 10   | 40                   | 1,6       | 3,0           |          |
| A67                                                                                                  | 5    | 3 000                | 3,5       | 1,1           |          |
|                                                                                                      | 10   | 40                   | 1,6       | 3,0           |          |
| controlo                                                                                             |      | 13 900               | 4,1       | -             |          |
| Mistura                                                                                              | g/kg | após 90 min,         |           |               | pH final |
|                                                                                                      |      | cfu/g <sup>1,2</sup> | log cfu/g | Δ log redução |          |
| controlo                                                                                             |      | 46 000               | 4,7       | -             | 4,68     |
| A64                                                                                                  | 5    | 19 300               | 4,3       | 0,4           | 4,45     |
|                                                                                                      | 10   | 2 400                | 3,4       | 1,3           | 4,32     |
| A65                                                                                                  | 5    | 200                  | 2,3       | 2,4           | 4,44     |
|                                                                                                      | 10   | 40                   | 1,6       | 3,1           | 4,25     |
| A66                                                                                                  | 5    | 13 500               | 4,1       | 0,6           | 4,37     |
|                                                                                                      | 10   | 40                   | 1,6       | 3,1           | 4,22     |
| A67                                                                                                  | 5    | 200                  | 2,3       | 2,4           | 4,33     |
|                                                                                                      | 10   | 40                   | 1,6       | 3,1           | 4,02     |
| controlo                                                                                             |      | 38 800               | 4,6       | -             | 4,68     |

<sup>1</sup>40 cfu/g (nível de detecção mínimo) relatado quando não se detecta *Salmonella*.

<sup>2</sup> Leitura simples para cada tratamento.

Três das quatro misturas ensaiadas apresentam efeito bactericida completo numa aplicação a 10 g/kg (1%). Ambas as misturas A65 e A67 mostram efeito bactericida significativo na taxa de aplicação mais baixa (0,5%).

#### EXEMPLO 12

Estudou-se o efeito das misturas de ácidos orgânicos sobre as contagens de *Salmonella* utilizando dietas padrão de aves de capoeira e porcos. Ensaíram-se misturas A70 e A71 utilizando a dieta baseada em milho e soja estabelecida na **tabela 9**, anteriormente, com DLM adicionada a 0,2%. O modelo de dieta de aves de capoeira foi uma dieta de poedeiras baseada em milho e soja, sem produtos de carne; ensaiaram-se os efeitos das misturas A68 e A69 com esta dieta.

Adicionaram-se as misturas a 1 g de amostra de ração. Adicionou-se salmonela (200 µL, 40 000 cfu) a cada amostra de ração e misturou-se. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente, seguidamente diluiu-se 1:10 com água e plaqueou-se em placa BG. Os resultados apresentam-se na **tabela 18**.

| Tabela 18                                                                                       |      |          |          |           |           |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| Efeito de misturas de ácidos em populações de <i>Salmonella</i> em dieta à base de milho e soja |      |          |          |           |           |           |
| mistura                                                                                         | g/kg | pH final | após 1 h |           | após 24 h |           |
|                                                                                                 |      |          | cfu/g    | log cfu/g | cfu/g     | log cfu/g |
| controlo (Dieta #1)                                                                             |      | 5,83     | 12 400   | 4,1       | 10 133    | 4,0       |
| A70                                                                                             | 2    | 5,53     | 15 000   | 4,2       | 3 300     | 3,5       |
|                                                                                                 | 5    | 5,32     | 3 900    | 3,6       | 1 200     | 3,1       |
|                                                                                                 | 7,5  | 5,08     | 3 400    | 3,5       | 700       | 2,8       |
|                                                                                                 | 10   | 4,94     | 1 500    | 3,2       | 100       | 2,0       |
| A71                                                                                             | 2    | 5,42     | 9 600    | 4,0       | 2 300     | 3,4       |
|                                                                                                 | 5    | 5,16     | 1 300    | 3,1       | 100       | 2,0       |
|                                                                                                 | 7,5  | 4,84     | 200      | 2,3       | 100       | 2,0       |
|                                                                                                 | 10   | 4,66     | 100      | 2,0       | 100       | 2,0       |



| Tabela 18                                                                                       |      |          |          |           |           |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| Efeito de misturas de ácidos em populações de <i>Salmonella</i> em dieta à base de milho e soja |      |          |          |           |           |           |
| mistura                                                                                         | g/kg | pH final | após 1 h |           | após 24 h |           |
|                                                                                                 |      |          | cfu/g    | log cfu/g | cfu/g     | log cfu/g |
| controle (Dieta #2)                                                                             |      | 5,92     | 15 300   | 4,2       | 6 300     | 3,8       |
| A68                                                                                             | 2    | 5,70     | 10 400   | 4,0       | 5 600     | 3,7       |
|                                                                                                 | 5    | 5,67     | 6 300    | 3,8       | 4 200     | 3,6       |
|                                                                                                 | 7,5  | 5,54     | 9 900    | 4,0       | 2 600     | 3,4       |
|                                                                                                 | 10   | 5,36     | 8 300    | 3,9       | 1 300     | 3,1       |
| A69                                                                                             | 2    | 5,53     | 7 800    | 3,9       | 3 300     | 3,5       |
|                                                                                                 | 5    | 5,29     | 3 600    | 3,6       | 1 200     | 3,1       |
|                                                                                                 | 7,5  | 5,22     | 1 200    | 3,1       | 300       | 2,5       |
|                                                                                                 | 10   | 5,08     | 1 000    | 3,0       | 100       | 2,0       |

### EXEMPLO 13

Comparou-se o efeito antibacteriano de duas misturas de ácido orgânico/Alimet® com misturas contendo ácido fórmico e ácido propiônico e sem Alimet®, seguindo o procedimento apresentado no exemplo 12. Os resultados após 90 minutos apresentam-se na **tabela 19**.

| Tabela 19 |      |        |           |          |
|-----------|------|--------|-----------|----------|
| Mistura   | g/kg | cfu/g  | log cfu/g | pH final |
| controle  |      | 29 400 | 4,5       | 4,54     |
| A65       | 2    | 140    | 2,1       | 4,56     |
|           | 5    | 80     | 1,9       | 4,45     |
|           | 10   | 1      | 0         | 4,32     |
| A67       | 2    | 900    | 3,0       | 4,57     |
|           | 5    | 1 100  | 3,0       | 4,49     |
|           | 10   | 1      | 0         | 4,25     |

| Tabela 19 |      |        |           |          |
|-----------|------|--------|-----------|----------|
| Mistura   | g/kg | cfu/g  | log cfu/g | pH final |
| A72       | 2    | 2 100  | 3,3       | 4,5      |
|           | 5    | 90     | 2         | 4,39     |
|           | 10   | 1      | 0         | 4,15     |
| A73       | 2    | 2 700  | 3,4       | 4,51     |
|           | 5    | 600    | 2,8       | 4,4      |
|           | 10   | 1      | 0         | 4,1      |
| controlo  |      | 30 650 | 4,5       | 4,68     |

#### EXEMPLO comparativo 14

Comparou-se o efeito antibacteriano de dois lotes diferentes de Alimet<sup>®</sup> numa dieta de milho e soja (consultar a **tabela 9**, anterior). O primeiro lote tinha idade desconhecida e o segundo lote foi preparado de fresco (menos de duas semanas). Utilizou-se o protocolo apresentando no **exemplo 9** e os resultados apresentam-se na **tabela 20**.

| Tabela 20                                                                                                                                           |                 |        |           |      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|--------|-----------|------|
| Efeito de dois lotes diferentes de Alimet <sup>®</sup> em populações de <i>Salmonella</i> em dieta à base de milho e soja após 90 min. de incubação |                 |        |           |      |
| Ácido                                                                                                                                               | g/kg adicionado | cfu/g  | log cfu/g | pH   |
| controlo                                                                                                                                            |                 | 6 850  | 3,8       | 4,80 |
| Lote 1 de Alimet <sup>®</sup>                                                                                                                       | 2,3             | 800    | 2,9       | 4,72 |
|                                                                                                                                                     | 5,7             | 50     | 1,7       | 4,66 |
|                                                                                                                                                     | 8,5             | 120    | 2,1       | 4,58 |
|                                                                                                                                                     | 11,4            | 0      | –         | 4,57 |
| Lote 2 de Alimet <sup>®</sup>                                                                                                                       | 2,3             | 3 900  | 3,6       | 4,68 |
|                                                                                                                                                     | 5,7             | 300    | 2,5       | 4,54 |
|                                                                                                                                                     | 8,5             | 20     | 1,3       | 4,61 |
|                                                                                                                                                     | 11,4            | 20     | 1,3       | 4,57 |
| controlo                                                                                                                                            |                 | 14 850 | 4,2       | 4,80 |

O primeiro lote de Alimet® apresentou efeitos bactericidas ligeiramente melhores a baixas concentrações. Ambos os lotes foram bactericidas a doses superiores.

#### EXEMPLO comparativo 15

Estudou-se o efeito antibacteriano de ácidos secos (fumárico, tartárico e sórbico) sozinhos e em combinação com misturas de Alimet® de acordo com o protocolo do **exemplo 9**. As formulações das misturas estudadas apresentam-se na **tabela 21**. Os resultados após 90 minutos apresentam-se na **tabela 22**.

| Tabela 21 |                              |          |           |         |
|-----------|------------------------------|----------|-----------|---------|
| Mistura   | Concentração de ácido (g/kg) |          |           |         |
|           | Alimet®                      | Fumárico | Tartárico | Sórbico |
| A74       | 10                           | 0        | 0         | 0       |
| A75       | 0                            | 10       | 0         | 0       |
| A76       | 0                            | 0        | 10        | 0       |
| A77       | 0                            | 0        | 0         | 10      |
| A78       | 5                            | 5        | 0         | 0       |
| A79       | 5                            | 0        | 5         | 0       |
| A80       | 5                            | 0        | 0         | 5       |

| Tabela 22 |       |           |                  |
|-----------|-------|-----------|------------------|
| Mistura   | cfu/g | log cfu/g | Δ log de redução |
| controlo  | 27900 | 4,4       |                  |
| A74       | 40    | 1,6       | 2,8              |
| A75       | 30    | 1,5       | 3,0              |
| A76       | 14450 | 4,2       | 0,3              |
| A77       | 1150  | 3,1       | 1,4              |
| A78       | 0     | –         | 4,4              |
| A79       | 4600  | 3,7       | 0,8              |
| A80       | 170   | 2,2       | 2,2              |
| controlo  | 13900 | 4,1       |                  |

EXEMPLO comparativo 16

Estudou-se o efeito de ácido fórmico em *Lactobacillus plantarum*. Tal como demonstrado no **exemplo 1**, a adição de Alimet® a pH 3,5 a um meio contendo bactérias apresentou um efeito letal evidente em *L. plantarum* a doses de 3 e 5 g/l. Estudaram-se também concentrações comparáveis de ácido fórmico (qualidade técnica 85%, de Franklin Products) e comparou-se com Alimet®.

Utilizou-se cultura fresca durante a noite de *L. plantarum* em meio de infusão cérebro coração para inocular meio 5 a log 4,1 cfu/mL a pH 3,5. Incubaram-se os tubos em atmosfera com oxigénio reduzido durante 6 horas a 37 °C. Efectuaram-se contagens de colónias de acordo com procedimentos padrão. Todas as análises foram efectuadas em duplicado e os resultados apresentam-se na **tabela 23**.

| <b>Tabela 23</b>                                                                                         |      |            |              |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|------------|--------------|
| Efeito de Alimet® e ácido fórmico em contagens de colónias de <i>L. plantarum</i> em meio (após 6 horas) |      |            |              |
| log cfu/mL inicial = 5,61 $\Delta$ log = log <sub>6 horas</sub> - log <sub>inicial</sub>                 |      |            |              |
| Ácido                                                                                                    | g/kg | log cfu/mL | $\Delta$ log |
| controlo                                                                                                 |      | 5,67       | 0,06         |
| Alimet®                                                                                                  | 3    | 3,02       | -2,59        |
|                                                                                                          | 5    | 0,83       | -4,78        |
| ácido fórmico                                                                                            | 3    | 3,19       | -2,42        |
|                                                                                                          | 5    | -0,30      | -5,91        |

EXEMPLO comparativo 17

Estudaram-se misturas de vários ácidos com Alimet® a pH 4,5. Estudou-se o efeito destas misturas nas contagens de colónias de *S. enteritidis* em meio, utilizando o protocolo estabelecido no **exemplo 1**. Os resultados apresentam-se nas **tabelas 24-26**.

| Tabela 24                                                                                         |          |           |             |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-----------|-------------|------------|
| Efeitos de misturas de ácidos e Alimet® em contagens de colónias de <i>S. enteritidis</i> em meio |          |           |             |            |
| Mistura                                                                                           | Ácido    | Ácido g/L | Alimet® g/L | log cfu/mL |
| Controlo                                                                                          |          |           |             | 5,04       |
| Controlo (Alimet®)                                                                                |          |           |             | -0,30      |
| A81                                                                                               | fórmico  | 5         | 0           | 3,93       |
| A82                                                                                               |          | 4,5       | 0,5         | 0,74       |
| A83                                                                                               |          | 4         | 1           | 0,24       |
| A84                                                                                               |          | 3,75      | 1,25        | 0,15       |
| A85                                                                                               |          | 3,5       | 1,5         | -0,15      |
| A86                                                                                               |          | 2,5       | 2,5         | -0,30      |
| A87                                                                                               | butírico | 5         | 0           | 4,44       |
| A88                                                                                               |          | 4,5       | 0,5         | 3,56       |
| A89                                                                                               |          | 4         | 1           | 1,70       |
| A90                                                                                               |          | 3,75      | 1,25        | 1,44       |
| A91                                                                                               |          | 3,5       | 1,5         | -0,15      |
| A92                                                                                               |          | 2,5       | 2,5         | -0,30      |
| A93                                                                                               | cítrico  | 5         | 0           | 4,74       |
| A94                                                                                               |          | 4,5       | 0,5         | 4,40       |
| A95                                                                                               |          | 4         | 1           | 4,34       |
| A96                                                                                               |          | 3,75      | 1,25        | 1,59       |
| A97                                                                                               |          | 3,5       | 1,5         | 1,19       |
| A98                                                                                               |          | 2,5       | 2,5         | 0,24       |

| Tabela 25                                                                                                        |          |           |             |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-----------|-------------|------------|
| Efeitos de misturas de ácidos ou formaldeído e Alimet® em contagens de colónias de <i>S. enteritidis</i> em meio |          |           |             |            |
| Mistura                                                                                                          | Ácido    | Ácido g/L | Alimet® g/L | log cfu/mL |
| Controlo                                                                                                         |          |           |             | 5,02       |
| Controlo (Alimet®)                                                                                               |          |           |             | 0,00       |
| A99                                                                                                              | fumárico | 5         | 0           | 4,68       |
| A100                                                                                                             |          | 4,5       | 0,5         | 4,65       |
| A101                                                                                                             |          | 4         | 1           | 4,43       |
| A102                                                                                                             |          | 3,75      | 1,25        | 4,38       |
| A103                                                                                                             |          | 3,5       | 1,5         | 4,36       |
| A104                                                                                                             |          | 2,5       | 2,5         | 2,32       |
| A105                                                                                                             | lático   | 5         | 0           | 4,44       |
| A106                                                                                                             |          | 4,5       | 0,5         | 4,48       |
| A107                                                                                                             |          | 4         | 1           | 4,43       |
| A108                                                                                                             |          | 3,75      | 1,25        | 4,51       |
| A109                                                                                                             |          | 3,5       | 1,5         | 4,75       |
| A110                                                                                                             |          | 2,5       | 2,5         | 4,55       |
| A111                                                                                                             | málico   | 5         | 0           | 5,01       |
| A112                                                                                                             |          | 4,5       | 0,5         | 4,71       |
| A113                                                                                                             |          | 4         | 1           | 4,77       |
| A114                                                                                                             |          | 3,75      | 1,25        | 4,91       |
| A115                                                                                                             |          | 3,5       | 1,5         | 4,96       |
| A116                                                                                                             |          | 2,5       | 2,5         | 4,89       |

| Tabela 26                                                                                                        |             |           |             |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-----------|-------------|------------|
| Efeitos de misturas de ácidos ou formaldeído e Alimet® em contagens de colónias de <i>S. enteritidis</i> em meio |             |           |             |            |
| Mistura                                                                                                          | Ácido       | Ácido g/L | Alimet® g/L | log cfu/mL |
| Controlo                                                                                                         |             |           |             | 4,95       |
| Controlo (Alimet®)                                                                                               |             |           |             | 0,63       |
| A117                                                                                                             | propiónico  | 5         | 0           | 4,34       |
| A118                                                                                                             |             | 4,5       | 0,5         | 4,34       |
| A119                                                                                                             |             | 4         | 1           | 4,10       |
| A120                                                                                                             |             | 3,75      | 1,25        | 3,76       |
| A121                                                                                                             |             | 3,5       | 1,5         | 3,30       |
| A122                                                                                                             |             | 2,5       | 2,5         | 0,87       |
| A123                                                                                                             | fosfórico   | 5         | 0           | 4,68       |
| A124                                                                                                             |             | 4,5       | 0,5         | 4,67       |
| A125                                                                                                             |             | 4         | 1           | 4,56       |
| A126                                                                                                             |             | 3,75      | 1,25        | 4,62       |
| A127                                                                                                             |             | 3,5       | 1,5         | 4,48       |
| A128                                                                                                             |             | 2,5       | 2,5         | 3,30       |
| A129                                                                                                             | formaldeído | 5         | 0           | -0,30      |
| A130                                                                                                             |             | 4,5       | 0,5         | -0,30      |
| A131                                                                                                             |             | 4         | 1           | -0,30      |
| A132                                                                                                             |             | 3,75      | 1,25        | -0,30      |
| A133                                                                                                             |             | 3,5       | 1,5         | -0,30      |
| A134                                                                                                             |             | 2,5       | 2,5         | -0,30      |

Os ácidos fosfórico, fumárico, láctico, málico e propiónico não apresentam um efeito inibidor significativo a 5 g/l. As misturas destes ácidos com Alimet® apresentaram resultados semelhantes, excepto a mistura de ácido fumárico e Alimet® 50:50 que apresentou uma redução superior a 2 log da contagem de colónias comparativamente a ácido fumárico sozinho a 5 g/L e a mistura de ácido fosfórico e Alimet® 50:50 que apresentou uma redução de aproximadamente 1,3 log comparativamente a ácido fosfórico sozinho a 5 g/L.

As misturas de ácido fórmico e Alimet® tiveram um desempenho mais favorável do que o ácido fórmico sozinho para todas as misturas estudadas. Similarmente, as misturas de ácido butírico e Alimet® e ácido cítrico com Alimet® apresentaram efeitos bactericidas melhorados com o aumento da proporção de Alimet® adicionada.

#### EXEMPLO 18

Estudou-se o efeito antibacteriano de misturas de ácidos de acordo com o protocolo do **exemplo 9**. Obteve-se ácido fosfórico (75%) de Astaris (St. Louis, MO), lote # TK60. Obteve-se ácido L-láctico (80%) de Purac America (Lincolnshire, IL), lote # 015703-A. Obteve-se ácido butírico (99%) de Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI), lote # 0.5110A. As formulações das misturas estudadas apresentam-se na **tabela 27**. Os resultados apresentam-se na **tabela 28**.

| Tabela 27 |                                    |         |           |          |
|-----------|------------------------------------|---------|-----------|----------|
| Mistura   | Formulações de ácidos (% do total) |         |           |          |
|           | Alimet®                            | Láctico | Fosfórico | Butírico |
| A135      | 0,33                               | 0,67    | -         | -        |
| A136      | 0,317                              | 0,633   | 0,05      | -        |
| A137      | 0,267                              | 0,533   | 0,20      | -        |
| A138      | 0,25                               | 0,50    | 0,25      | -        |
| A139      | 0,33                               | 0,33    | -         | 0,33     |
| A140      | 0,317                              | 0,317   | 0,05      | 0,317    |
| A141      | 0,267                              | 0,267   | 0,20      | 0,267    |
| A142      | 0,25                               | 0,25    | 0,25      | 0,25     |
| A143      | 0,33                               | -       | -         | 0,67     |
| A144      | 0,317                              | -       | 0,05      | 0,633    |
| A145      | 0,267                              | -       | 0,20      | 0,533    |
| A146      | 0,25                               | -       | 0,25      | 0,50     |



| Tabela 28 |        |              |          |
|-----------|--------|--------------|----------|
| Mistura   | cfu/g  | log<br>cfu/g | pH final |
| controlo  | 7 900  | 3,9          | 4,86     |
| A135      | 20     | 1,3          | 4,49     |
| A136      | 20     | 1,3          | 4,39     |
| A137      | 340    | 2,5          | 4,52     |
| A138      | 160    | 2,2          | 4,44     |
| A139      | 80     | 1,9          | 4,50     |
| A140      | 20     | 1,3          | 4,49     |
| A141      | 160    | 2,2          | 4,42     |
| A142      | 160    | 2,2          | 4,43     |
| A143      | 160    | 2,2          | 4,48     |
| A144      | 40     | 1,6          | 4,48     |
| A145      | 240    | 2,4          | 4,53     |
| A146      | 20     | 1,3          | 4,42     |
| controlo  | 22 100 | 4,3          | 4,73     |

#### EXEMPLO 19

Ensaíram-se os efeitos da mistura A71 a pH neutro. Adicionou-se a mistura a 1 g de amostra de ração. Adicionou-se *Salmonella* (40 000 cfu (65 ul)) a cada amostra de 1 g, misturou-se e incubou-se à temperatura ambiente. A seguir à incubação, diluíram-se as amostras 1:10 com água e plaquearam-se numa placa BG.

Estudaram-se duas dietas, tal como apresentado na **tabela 29**. Os resultados apresentam-se na **tabela 30**.

| Tabela 29                          |            |
|------------------------------------|------------|
| Dieta 1 (dieta para suínos)        |            |
| Ingredientes                       | % do total |
| Milho                              | 51,60      |
| SBM, 48                            | 30         |
| DairyLac 80                        | 8,50       |
| Farinha de peixe Menhaden (Select) | 3,98       |
| Gordura branca seleccionada        | 3,00       |
| Fosfato de dicálcio                | 1,24       |
| Calcário                           | 0,34       |
| Lisina                             | 0,26       |
| DL-Metionina                       | 0,13       |
| Treonina                           | 0,16       |
| Vitaminas, TM, Sal e Mecadox       | 0,93       |
| Amido de milho                     | para 100   |
| Dieta 2 (dieta para pintos)        |            |
| Ingredientes                       | % do total |
| Milho                              | 60,551     |
| SBM                                | 32,254     |
| Gordura, animal                    | 3,665      |
| Fosfato de dicálcio                | 1,861      |
| Calcário                           | 0,811      |
| Pré-mistura vitaminas/minerais     | 0,350      |
| Sal                                | 0,340      |
| L-lisina HCl 78%                   | 0,097      |
| Treonina                           | 0,051      |
| Satoquin-mix6                      | 0,019      |
| Sulfato de cobre                   | 0,003      |
| DL-metionina                       | 0,2        |

| Tabela 30             |        |     |          |     |          |     |          |
|-----------------------|--------|-----|----------|-----|----------|-----|----------|
| Mistura ensaiada: A71 |        |     |          |     |          |     |          |
| g/kg                  | 1 hora |     | 24 horas |     | 48 horas |     | pH final |
|                       | cfu/g  | log | cfu/g    | log | cfu/g    | log |          |
| Dieta 1               |        |     |          |     |          |     |          |
| controle              | 27 700 | 4,4 | 6 432    | 3,8 | 2 530    | 3,4 | 5,83     |
| 2                     | 4 320  | 3,6 | 80       | 1,9 | 40       | 1,6 | 5,52     |
| 5                     | 3 840  | 3,6 | 40       | 1,6 | 0        | –   | 5,21     |
| 7,5                   | 3 080  | 3,5 | 80       | 1,9 | 0        | –   | 5,01     |
| 10                    | 1 560  | 3,2 | 0        | –   | 0        | –   | 4,87     |
| Dieta 2               |        |     |          |     |          |     |          |
| controle              | 25 000 | 4,4 | 6 160    | 3,8 | 2 570    | 3,4 | 6,06     |
| 2                     | 8 080  | 3,9 | 40       | 1,6 | 40       | 1,6 | 5,67     |
| 5                     | 7 000  | 3,8 | 40       | 1,6 | 40       | 1,6 | 5,31     |
| 7,5                   | 4 400  | 3,6 | 40       | 1,6 | 0        | –   | 5,1      |
| 10                    | 900    | 3,0 | 0        | –   | 0        | –   | 4,82     |

EXEMPLO 20

Seguindo o protocolo do exemplo 19, ensaiaram-se os efeitos da mistura A69 a pH neutro. Obteve-se ácido fórmico (85%) de BASF Corporation (Mt. Olive, NJ), produto # 019723, lote # 87656216KO. Estudaram-se duas dietas, tal como apresentado na **tabela 31**. Apresentam-se os resultados na **tabela 32**.

| Tabela 31                         |            |
|-----------------------------------|------------|
| Dieta 3                           |            |
| Ingredientes                      | % do total |
| Farinha de soja                   | 33,40      |
| Milho                             | 32,85      |
| Trigo vermelho duro               | 20,00      |
| Farinha de ervilhas orgânicas     | 5,00       |
| Gordura, animal                   | 4,80       |
| Fosfato de dicálcio               | 1,81       |
| Calcário                          | 0,98       |
| Sal                               | 0,43       |
| Pré-mistura de vitaminas/minerais | 0,35       |
| Treonina                          | 0,10       |
| Avizyme1502                       | 0,10       |
| Santoquin-mix6                    | 0,02       |
| Coban 60                          | 0,05       |
| Sulfato de cobre                  | 0,00       |
| Dieta 4                           |            |
| Ingredientes                      | % do total |
| Milho                             | 60,50      |
| Farinha de soja                   | 28,46      |
| Calcário                          | 7,76       |
| Fosfato de dicálcio               | 1,63       |
| Gordura animal                    | 1,00       |
| Pré-mistura de vitaminas/minerais | 0,35       |
| Sal                               | 0,26       |
| Santoquin-mix6                    | 0,02       |
| Sulfato de cobre                  | 0,00       |
| Colina Cl-60%                     | 0,00       |

| Tabela 32             |        |     |          |     |          |     |          |
|-----------------------|--------|-----|----------|-----|----------|-----|----------|
| Mistura ensaiada: A69 |        |     |          |     |          |     |          |
| g/kg                  | 1 hora |     | 24 horas |     | 48 horas |     | pH final |
|                       | cfu/g  | log | cfu/g    | log | cfu/g    | log |          |
| Dieta 3               |        |     |          |     |          |     |          |
| controlo              | 68 000 | 4,8 | 2 470    | 3,4 | 880      | 2,9 | 6,05     |
| 2                     | 5 600  | 3,7 | 120      | 2,1 | 40       | 1,6 | 5,67     |
| 5                     | 8 900  | 3,9 | 40       | 1,6 | 40       | 1,6 | 5,46     |
| 7,5                   | 4 600  | 3,7 | 40       | 1,6 | 80       | 1,9 | 5,28     |
| 10                    | 10 600 | 4,0 | 40       | 1,6 | 0        | -   | 5,13     |
| Dieta 4               |        |     |          |     |          |     |          |
| controlo              | 68 000 | 4,8 | 2 630    | 3,4 | 1 380    | 3,1 | 5,99     |
| 2                     | 8 600  | 3,9 | 0        | -   | 0        | -   | 5,8      |
| 5                     | 900    | 3,0 | 40       | 1,6 | 0        | -   | 5,55     |
| 7,5                   | 2 600  | 3,4 | 200      | 2,3 | 0        | -   | 5,37     |
| 10                    | 2 700  | 3,4 | 0        | -   | 40       | 1,6 | 5,12     |

EXEMPLO 21

Seguindo o protocolo do **exemplo 9**, estudaram-se os efeitos de misturas de Alimet®, ácido láctico, ácido fórmico e/ou ácido butírico. As formulações das misturas apresentam-se na **tabela 33**. Efectuaram-se até cinco réplicas e apresentam-se os resultados nas **tabelas 34 e 35**.

| Tabela 33                    |                |                |                |                |  |         |                |                |                |                |
|------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--|---------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Formulações de ácidos (g/kg) |                |                |                |                |  |         |                |                |                |                |
| Mistura                      | A <sup>1</sup> | L <sup>2</sup> | F <sup>3</sup> | B <sup>4</sup> |  | Mistura | A <sup>1</sup> | L <sup>2</sup> | F <sup>3</sup> | B <sup>4</sup> |
| A147                         | 0              | 0              | 0              | 10             |  | A162    | 0              | 0              | 6,7            | 3,3            |
| A148                         | 2              | 0              | 0              | 8              |  | A163    | 2              | 0              | 5,3            | 2,67           |
| A149                         | 7,5            | 0              | 0              | 2,5            |  | A164    | 7,5            | 0              | 1,67           | 0,8            |
| A150                         | 3,3            | 0              | 0              | 6,7            |  | A165    | 0              | 10             | 0              | 0              |
| A151                         | 2              | 2,67           | 0              | 5,33           |  | A166    | 2              | 8              | 0              | 0              |
| A152                         | 7,5            | 0,8            | 0              | 1,67           |  | A167    | 7,5            | 2,5            | 0              | 0              |
| A153                         | 0              | 0              | 3,3            | 6,7            |  | A168    | 0              | 6,7            | 3,3            | 0              |
| A154                         | 2              | 0              | 2,67           | 5,3            |  | A169    | 2              | 5,3            | 2,67           | 0              |
| A155                         | 7,5            | 0              | 0,8            | 1,67           |  | A170    | 7,5            | 1,67           | 0,8            | 0              |
| A156                         | 0              | 6,7            | 0              | 3,3            |  | A171    | 0              | 3,3            | 6,7            | 0              |
| A157                         | 2              | 5,3            | 0              | 2,67           |  | A172    | 2              | 2,67           | 5,3            | 0              |
| A158                         | 7,5            | 1,67           | 0              | 0,8            |  | A173    | 7,5            | 0,8            | 1,67           | 0              |
| A159                         | 0              | 3,3            | 3,3            | 3,3            |  | A174    | 0              | 0              | 10             | 0              |
| A160                         | 2              | 2,67           | 2,67           | 2,67           |  | A175    | 2              | 0              | 8              | 0              |
| A161                         | 7,5            | 0,8            | 0,8            | 0,8            |  | A176    | 7,5            | 0              | 2,5            | 0              |

<sup>1</sup> Alimet®

<sup>2</sup> Ácido láctico

<sup>3</sup> Ácido fórmico

<sup>4</sup> Ácido butírico

Tabela 34

| Ensaio:  | Média  |     |              | 1      | 2      | 3      | 4     |
|----------|--------|-----|--------------|--------|--------|--------|-------|
| Mistura  | cfu/g  | log | $\Delta$ log | cfu/g  | cfu/g  | cfu/g  | cfu/g |
| controlo | 49 200 | 4,7 | –            | 58 200 | 43 400 | 46 000 | N/A   |
| A147     | 18 800 | 4,3 | 0,4          | 22 200 | 15 400 | N/A    | N/A   |
| A148     | 15 700 | 4,2 | 0,5          | 19 800 | 11 600 | N/A    | N/A   |
| A149     | 70     | 1,8 | 2,8          | 80     | 200    | 0      | 0     |
| A150     | 12 300 | 4,1 | 0,6          | 1 200  | 23 400 | N/A    | N/A   |
| A151     | 6 000  | 3,8 | 0,9          | 8 200  | 3 800  | N/A    | N/A   |
| A152     | 60     | 1,8 | 2,9          | 40     | 40     | 120    | 40    |
| A153     | 1 600  | 3,2 | 1,5          | 3 200  | 0      | N/A    | N/A   |
| A154     | 20     | 1,3 | 3,4          | 40     | 40     | 0      | 0     |
| A155     | 10     | 1,0 | 3,7          | 40     | 0      | 0      | 0     |
| A156     | 11 300 | 4,1 | 0,6          | 6 000  | 16 600 | N/A    | N/A   |
| A157     | 2 900  | 3,5 | 1,2          | 1 000  | 4 800  | N/A    | N/A   |
| A158     | 400    | 2,6 | 2,1          | 800    | 0      | N/A    | N/A   |
| A159     | 0      | –   | 4,7          | 0      | 0      | 0      | 0     |
| A160     | 0      | –   | 4,7          | 0      | 0      | 0      | 0     |
| A161     | 20     | 1,3 | 3,4          | 40     | 40     | 0      | 0     |
| controlo | 63 133 | 4,8 | –            | 56 800 | 64 000 | 68 600 | N/A   |

N/A = Não se efectuou réplica

| Tabela 35                     |        |     |              |        |        |        |       |
|-------------------------------|--------|-----|--------------|--------|--------|--------|-------|
| Ensaio:                       | Média  |     |              | 1      | 2      | 3      | 4     |
| Mistura                       | cfu/g  | log | $\Delta$ log | cfu/g  | cfu/g  | cfu/g  | cfu/g |
| controlo                      | 25 666 | 4,4 | -            | 23 200 | 25 800 | 28 000 | N/A   |
| A162                          | 0      | -   | 4,4          | 0      | 0      | 0      | 0     |
| A163                          | 0      | -   | 4,4          | 0      | 0      | 0      | 0     |
| A164                          | 0      | -   | 4,4          | 0      | 0      | 0      | 0     |
| A165                          | 5 100  | 3,7 | 0,7          | 4 000  | 6 200  | N/A    | N/A   |
| A166                          | 150    | 2,2 | 2,2          | 120    | 120    | 120    | 240   |
| A167                          | 30     | 1,5 | 2,9          | 40     | 80     | 0      | 0     |
| A168                          | 0      | -   | 4,4          | 0      | 0      | 0      | 0     |
| A169                          | 0      | -   | 4,4          | 0      | 0      | 0      | 0     |
| A170                          | 0      | -   | 4,4          | 0      | 0      | 0      | 0     |
| A171                          | 0      | -   | 4,4          | 0      | 0      | 0      | 0     |
| A172                          | 0      | -   | 4,4          | 0      | 0      | 0      | 0     |
| A173                          | 0      | -   | 4,4          | 0      | 0      | 0      | 0     |
| A174                          | 0      | -   | 4,4          | 0      | 0      | 0      | 0     |
| A175                          | 0      | -   | 4,4          | 0      | 0      | 0      | 0     |
| A176                          | 0      | -   | 4,4          | 0      | 0      | 0      | 0     |
| controlo                      | 20000  | 4,3 | -            | 20200  | 19800  | N/A    | N/A   |
| N/A = Não se efectuou réplica |        |     |              |        |        |        |       |

### EXEMPLO 22

Seguindo o protocolo do **exemplo 9**, estudaram-se os efeitos de misturas de Alimet®, ácido láctico, ácido propiónico (99%, obtido de Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, lote P-1386), e/ou ácido butírico. As formulações das misturas apresentam-se na **tabela 36**. Efectuaram-se até cinco réplicas e os resultados apresentam-se nas **tabelas 37 e 38**.





Tabela 37

| Ensaio:  | Média  |     |              | 1      | 2      | 3      |
|----------|--------|-----|--------------|--------|--------|--------|
| Mistura  | cfu/g  | log | $\Delta$ log | cfu/g  | cfu/g  | cfu/g  |
| controlo | 20 067 | 4,3 |              | 17 200 | 18 800 | 24 200 |
| A177     | 6 333  | 3,8 | 0,5          | 5 400  | 7 000  | 6 600  |
| A178     | 500    | 2,7 | 1,6          | 400    | 600    | N/A    |
| A179     | 400    | 2,6 | 1,7          | 200    | 600    | N/A    |
| A180     | 1 400  | 3,1 | 1,2          | 1 400  | 1 400  | N/A    |
| A181     | 1 500  | 3,2 | 1,1          | 2 000  | 1 000  | N/A    |
| A182     | 100    | 2,0 | 2,3          | 200    | 0      | N/A    |
| A183     | 6 000  | 3,8 | 0,5          | 9 600  | 2 400  | N/A    |
| A184     | 6 900  | 3,8 | 0,5          | 8 800  | 5 000  | N/A    |
| A185     | 1 300  | 3,1 | 1,2          | 1 400  | 1 200  | N/A    |
| A186     | 4 100  | 3,6 | 0,7          | 5 400  | 2 800  | N/A    |
| A187     | 2 400  | 3,4 | 0,9          | 600    | 4 200  | N/A    |
| A188     | 400    | 2,6 | 1,7          | 200    | 600    | N/A    |
| A189     | 4 700  | 3,7 | 0,6          | 1 000  | 8 400  | N/A    |
| A190     | 7 300  | 3,9 | 0,4          | 7 800  | 6 800  | N/A    |
| A191     | 300    | 2,5 | 1,8          | 600    | 0      | N/A    |
| controlo | 18 733 | 4,3 |              | 20 000 | 22 800 | 13400  |

N/A = Não se efectuou réplica

| Tabela 38                     |        |     |              |        |        |        |       |
|-------------------------------|--------|-----|--------------|--------|--------|--------|-------|
| Ensaio:                       | Média  |     |              | 1      | 2      | 3      | 4     |
| Mistura                       | cfu/g  | log | $\Delta$ log | cfu/g  | cfu/g  | cfu/g  | cfu/g |
| controlo                      | 7 800  | 3,9 | -            | 9 800  | 7 200  | 6 400  | N/A   |
| A192                          | 6 100  | 3,8 | 0,4          | 6 600  | 5 600  | N/A    | N/A   |
| A193                          | 2 600  | 3,4 | 0,8          | 2 200  | 3 000  | N/A    | N/A   |
| A194                          | 25     | 1,4 | 2,8          | 50     | 50     | 0      | 0     |
| A195                          | 400    | 2,6 | 1,6          | 800    | 0      | N/A    | N/A   |
| A196                          | 300    | 2,5 | 1,7          | 200    | 400    | N/A    | N/A   |
| A197                          | 0      | -   | 4,2          | 0      | 0      | 0      | 0     |
| A198                          | 2 400  | 3,4 | 0,8          | 1 000  | 3 800  | N/A    | N/A   |
| A199                          | 600    | 2,8 | 1,4          | 0      | 1 200  | N/A    | N/A   |
| A200                          | 0      | -   | 4,2          | 0      | 0      | 0      | 0     |
| A201                          | 3 800  | 3,6 | 0,6          | 3 200  | 4 400  | N/A    | N/A   |
| A202                          | 900    | 3,0 | 1,2          | 1 000  | 800    | N/A    | N/A   |
| A203                          | 0      | -   | 4,2          | 0      | 0      | 0      | 0     |
| A204                          | 3 500  | 3,5 | 0,6          | 5 400  | 1 600  | N/A    | N/A   |
| A205                          | 100    | 2,0 | 2,2          | 200    | 0      | N/A    | N/A   |
| A206                          | 0      | -   | 4,2          | 0      | 0      | 0      | 0     |
| A207                          | 0      | -   | 4,2          | 0      | 0      | 0      | 0     |
| controlo                      | 30 600 | 4,5 | -            | 41 600 | 19 400 | 30 800 | N/A   |
| N/A = Não se efectuou réplica |        |     |              |        |        |        |       |

#### EXEMPLO comparativo 23

Estudou-se a capacidade de Alimet® e DLM funcionarem como intensificadores de sabor para ração para cães e gatos. Adicionou-se Alimet® e DLM a ração para cão e gato do tipo premium no misturador para ensaiar a aceitação da ração comparativamente com ração sem qualquer dos suplementos. A ração utilizada compreendeu proteína de boa qualidade e CP e gordura elevadas. Adicionou-se também um intensificador de sabor à ração. Adicionou-se Alimet® ou DLM ao misturador antes de extrusão. A formulação da dieta para felinos encontra-se

descrita na **tabela 39** e a da dieta para caninos na **tabela 40**. Os níveis de suplementação com Alimet®/DLM e as razões de ingestão encontram-se descritas na **tabela 41**. A razão de ingestão descreve a incidência relativa de selecção de uma ração relativamente a outra.

Para o estudo canino utilizaram-se vinte e um cães (sete cães pequenos, sete médios e sete grandes). Para o estudo felino, utilizaram-se vinte gatos maduros. Ofereceram-se aos animais duas escolhas de ração, colocadas em taças independentes. Ao longo de um período de dois dias, os cães tiveram acesso à ração durante 30 minutos; os gatos tiveram acesso durante 22 horas. Foi verificada qual a ração seleccionada e consumida em primeiro lugar.

| <b>Tabela 39</b>                                          |                         |
|-----------------------------------------------------------|-------------------------|
| Dieta para felinos                                        |                         |
| <b>Ingrediente</b>                                        | <b>% da dieta total</b> |
| Milho                                                     | 14,7                    |
| Produto secundário de aves de capoeira (cinzas reduzidas) | 20                      |
| Farinha de soja                                           | 12,5                    |
| Farinha de glúten de milho                                | 12,2                    |
| Farinha de carne e osso                                   | 4                       |
| Gordura animal                                            | 11,4                    |
| Trinca de arroz                                           | 19,4                    |
| Aromatizante                                              | 2                       |
| Farinhas de peixe                                         | 2                       |
| Ovos desidratados                                         | 0,5                     |
| Sal                                                       | 0,5                     |
| KCl                                                       | 0,5                     |
| Vitaminas                                                 | 0,2                     |
| Colina                                                    | 0,1                     |
| Taurina                                                   | 0,1                     |
| Tocoferol                                                 | 0,05                    |
| Minerais vestigiais                                       | 0,05                    |

| Tabela 40                                                 |                  |
|-----------------------------------------------------------|------------------|
| Dieta canina                                              |                  |
| Ingrediente                                               | % da dieta total |
| Milho                                                     | 33,0             |
| Cevada                                                    | 15,0             |
| Produto secundário de aves de capoeira (cinzas reduzidas) | 13,0             |
| Produto secundário de aves de capoeira                    | 12,0             |
| Farinha de soja                                           | 9,0              |
| Gordura animal                                            | 8,0              |
| Trinca de arroz                                           | 5,0              |
| Aromatizante                                              | 2,0              |
| Ovos desidratados                                         | 1,0              |
| Sal                                                       | 0,5              |
| Calcário                                                  | 0,36             |
| Vitaminas                                                 | 0,2              |
| Colina                                                    | 0,1              |
| Tocoferol                                                 | 0,05             |
| Minerais vestigiais                                       | 0,05             |

| Tabela 41                                                   |                   |
|-------------------------------------------------------------|-------------------|
| Comparação das rações                                       | Razão de ingestão |
| <b>Canina</b>                                               |                   |
| Alimet a 0,05% vs. controlo                                 | 2,07:1            |
| Alimet a 0,10% vs. controlo                                 | 5,58:1            |
| Alimet a 0,15% controlo                                     | 5,13:1            |
| DLM a 0,10% vs. controlo                                    | 5,32:1            |
| DLM a 0,15% DLM vs. controlo                                | 4,95:1            |
| Alimet a 0,10% vs. Alimet a 0,05%                           | 2,54:1            |
| Alimet a 0,15% vs. Alimet a 0,05%                           | 1,99:1            |
| Alimet a 0,15% vs. Alimet a 0,10%                           | 2,54:1            |
| DLM a 0,15% vs. DLM a 0,10%                                 | 1,57:1            |
| DLM a 0,10% vs. Alimet a 0,10%                              | 1,05:1            |
| DLM a 0,15% vs. Alimet a 0,15%                              | 2,5:1             |
| <b>Felina</b>                                               |                   |
| Alimet <sup>®</sup> a 0,20% vs. controlo                    | 1,67:1            |
| Alimet <sup>®</sup> a 0,25% vs. controlo                    | 1,91:1            |
| Alimet <sup>®</sup> a 0,30% vs. controlo                    | 1,85:1            |
| DLM a 0,25% vs. controlo                                    | 1,87:1            |
| DLM a 0,30% vs. controlo                                    | 1,63:1            |
| Alimet <sup>®</sup> a 0,25% vs. Alimet <sup>®</sup> a 0,20% | 1,30:1            |
| Alimet <sup>®</sup> a 0,30% vs. Alimet <sup>®</sup> a 0,20% | 1,26:1            |
| Alimet <sup>®</sup> a 0,30% vs. Alimet <sup>®</sup> a 0,25% | 1,16:1            |
| DLM a 0,30% vs. DLM a 0,25%                                 | 1,04:1            |
| DLM a 0,25% vs. Alimet <sup>®</sup> a 0,25%                 | 1,24:1            |
| DLM a 0,30% vs. Alimet <sup>®</sup> a 0,30%                 | 1,47:1            |

#### EXEMPLO comparativo 24

Estudou-se a aceitação de ração contendo Alimet<sup>®</sup> ou DLM para avaliar o consumo de dieta em condições sem escolha. Proporcionou-se ração aos animais (18 cães: 6 pequenos, 6

médios, 6 grandes; 15 gatos) durante uma semana. Monitorizou-se também o pH da urina de seis dos gatos.

Utilizaram-se as dietas descritas nas **tabelas 39 e 40** anteriores. As dietas foram suplementadas com Alimet<sup>®</sup> ou DLM (0,1% para o estudo canino, 0,25% para o estudo felino). Efectuaram-se ensaios de pH de urina adicionais com Alimet<sup>®</sup> a 0,3%.

Os resultados das experiências de pH da urina apresentam-se nas **tabelas 42 e 43**. Os resultados da taxa de aceitação apresentam-se na **tabela 44**.

| Tabela 42 |             |                |                |
|-----------|-------------|----------------|----------------|
| Gato N°   | pH da urina |                |                |
|           | Controlo    | Alimet a 0,25% | DL Met a 0,25% |
| 452       | 6,35        | 6,45           | 6,39           |
| 453       | 6,44        | 6,2            | 6,38           |
| 457       | 6,29        | 6,56           | 6,39           |
| 460       | 6,25        | 6,03           | 6,36           |
| 465       | 6,22        | 6              | 6,1            |
| 475       | 6,56        | 6,44           | 6,36           |

| Tabela 43 |             |                            |
|-----------|-------------|----------------------------|
| Gato N°   | pH da urina |                            |
|           | Controlo    | Alimet <sup>®</sup> a 0,3% |
| 450       | 6,20        | 6,03                       |
| 453       | 6,44        | 6,10                       |
| 465       | 6,04        | 5,53                       |
| 468       | 6,40        | 5,73                       |
| 469       | 6,68        | 6,31                       |

| Tabela 44              |       |                            |                    |
|------------------------|-------|----------------------------|--------------------|
| Nível de suplementação |       | Total de gramas consumidas |                    |
|                        |       | controlo                   | ração suplementada |
| Canino                 |       |                            |                    |
| Alimet®                | 0,05% | 5 046                      | 10 420             |
|                        | 0,1%  | 2 101                      | 11 714             |
|                        | 0,15% | 2 419                      | 12 978             |
| DLM                    | 0,1%  | 2 114                      | 11 244             |
|                        | 0,15% | 2 734                      | 13 542             |
| Felino                 |       |                            |                    |
| Alimet®                | 0,2%  | 1 111                      | 1 853              |
|                        | 0,25% | 955                        | 1 827              |
|                        | 0,3%  | 1 003                      | 1 858              |
| DLM                    | 0,25% | 985                        | 1 842              |
|                        | 0,3%  | 1 078                      | 1 754              |

Tendo em consideração o anterior, verificar-se-á que se atingiram os vários objectivos do invento e obtiveram-se outros resultados vantajosos.

Dado que se poderiam fazer várias alterações nas rações e métodos anteriores sem afastamento do âmbito do invento, pretende-se que todo o material contida na descrição anterior e apresentada nos esquemas anexos deva ser interpretado como ilustrativo e não num sentido limitativo.

Na introdução de elementos do presente invento ou da(s) sua(s) concretização(ões) preferida(s), pretende-se que os artigos "um", "uma", "o", "a" e "referido" signifiquem que há um ou mais dos elementos. As expressões "compreendendo", "incluindo" e "contendo" pretende-se que sejam inclusivas e significa que pode haver elementos adicionais além dos elementos listados.



Salvo indicação em contrário, as quantidades expressas em percentagem são em percentagem de peso.

Lisboa, 2011-08-19

REIVINDICAÇÕES

1. Composição antimicrobiana compreendendo ácido 2-hidroxi-4-(metiltio)butanóico ou um seu sal e dois outros ácidos orgânicos seleccionados de ácido butírico, ácido láctico, ácido fórmico e ácido propiónico.

2. Composição antimicrobiana de acordo com a reivindicação 1, compreendendo adicionalmente um agente acidificante seleccionado do grupo que consiste de ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido fosforoso, ácido clorídrico, ácido bromídrico e ácido nítrico.

3. Composição antimicrobiana de acordo com a reivindicação 1, compreendendo adicionalmente pelo menos um ácido orgânico adicional seleccionado do grupo que consiste de ácido acético, ácido benzóico, ácido málico, ácido tartárico, ácido mandélico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido sórbico, ácido bórico, ácido succínico, ácido adípico, ácido glicólico e ácido glutárico.

4. Composição antimicrobiana de acordo com a reivindicação 1, compreendendo ácido 2-hidroxi-4-(metiltio)butanóico, ácido butírico e ácido láctico.

5. Composição antimicrobiana de acordo com a reivindicação 3, compreendendo ácido 2-hidroxi-4-(metiltio)butanóico, ácido butírico, ácido fórmico e ácido láctico.

6. Composição antimicrobiana de acordo com a reivindicação 3, compreendendo ácido 2-hidroxi-4-(metiltio)butanóico, ácido fosfórico, ácido butírico, ácido láctico e ácido propiónico.

7. Composição antimicrobiana de acordo com a reivindicação 3, compreendendo ácido 2-hidroxi-4-(metiltio)butanóico; ácido fosfórico, ácido butírico, ácido fórmico e ácido propiónico.

8. Processo para preparar uma composição antibacteriana de acordo com a reivindicação 1, compreendendo misturar ácido

2-hidroxi-4-(metiltio)butanóico com dois outros ácidos orgânicos seleccionados de ácido butírico, ácido láctico, ácido fórmico e ácido propiónico.

9. Utilização de uma composição antibacteriana de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7 para inibir ou matar *Salmonella* em alimentos.

10. Utilização de acordo com a reivindicação 9, em que os alimentos são seleccionados do grupo que consiste de alimentos para humanos, alimentos para gado, alimentos para animais de estimação ou alimentos para aquacultura.

11. Utilização de acordo com a reivindicação 9 ou reivindicação 10, em que a composição antimicrobiana é misturada com os alimentos, tal como é formulada.

12. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 9 a 11, em que os alimentos são proporcionados a um animal seleccionado do grupo que consiste de vacas leiteiras, vacas leiteiras em aleitamento, vitelas leiteiras, gado para carne, ovelhas, cabras, peixes, crustáceos, cavalos, frangos, perus, cães e gatos.

13. Utilização de acordo com a reivindicação 12, em que o alimento é proporcionado a um animal ruminante.

Lisboa, 2011-08-19

FIG. 1A

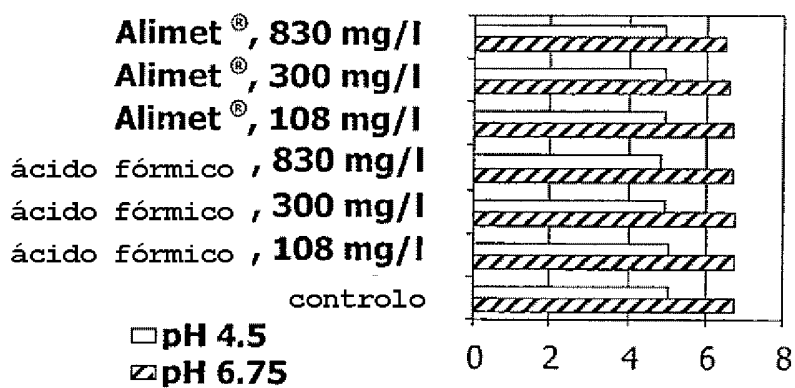


FIG. 1B

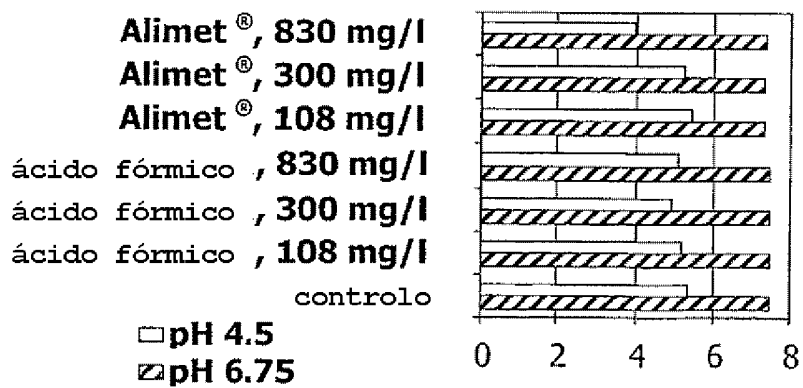


FIG. 1C

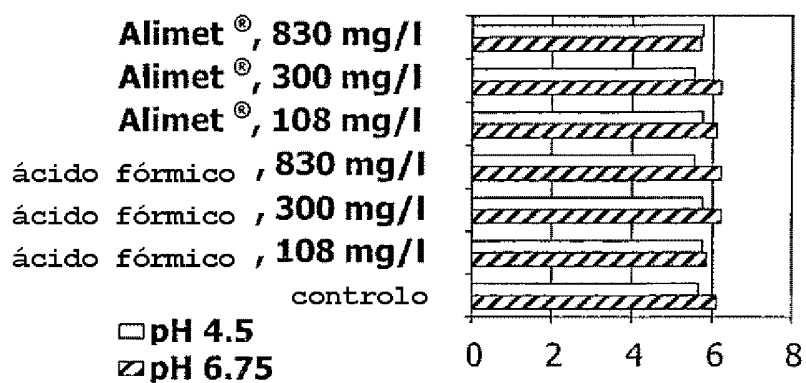


FIG. 1D

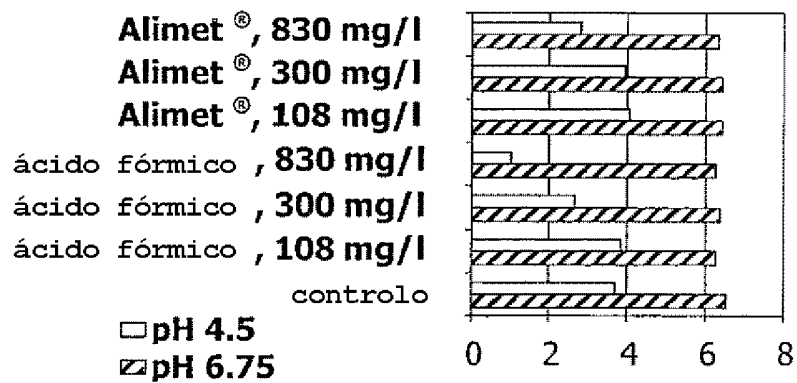


FIG. 2A

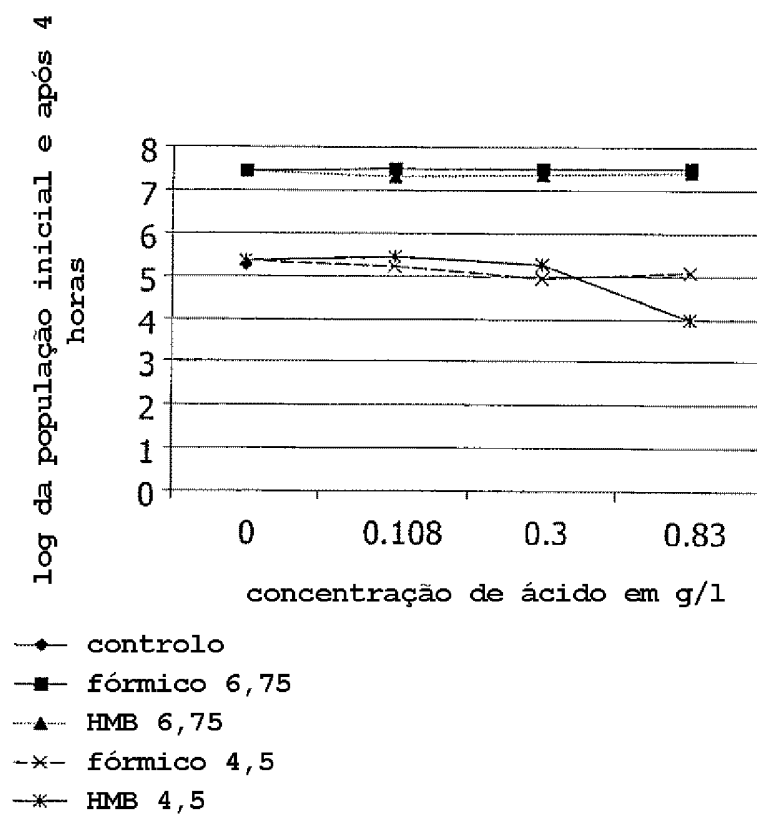


FIG. 2B

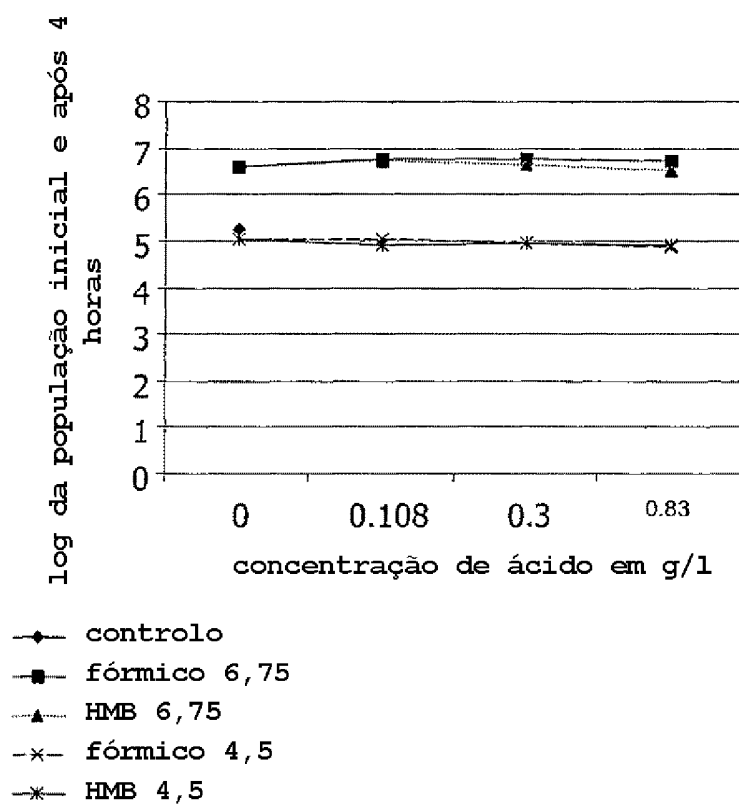


FIG. 2C

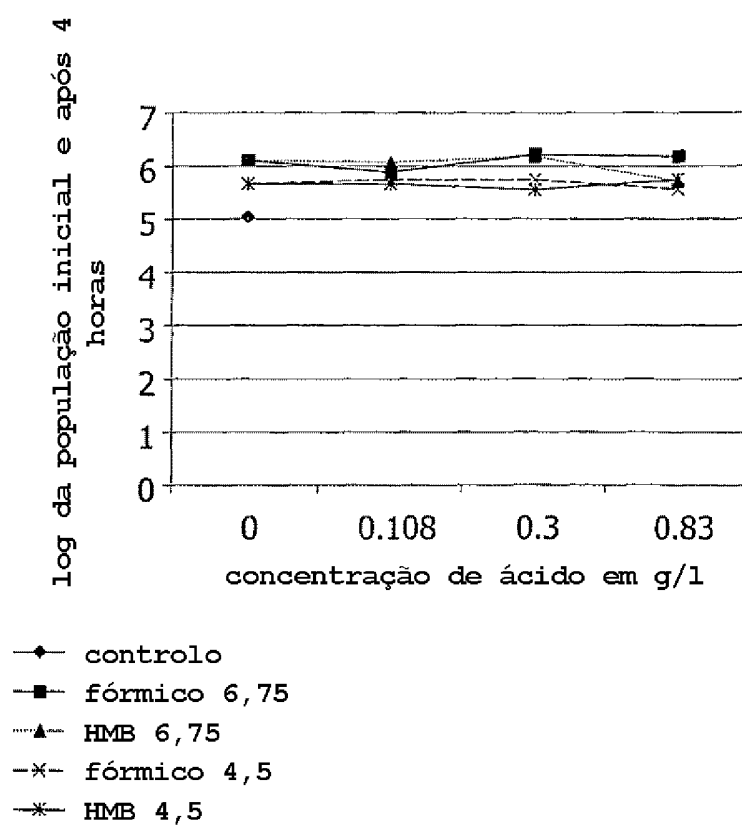




FIG. 2D

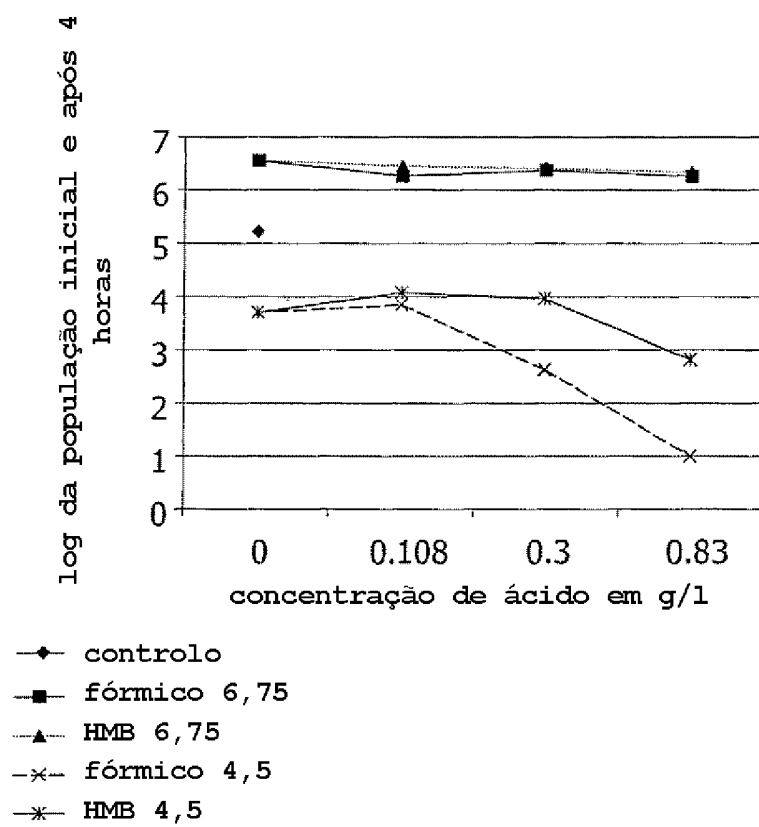


FIG. 3

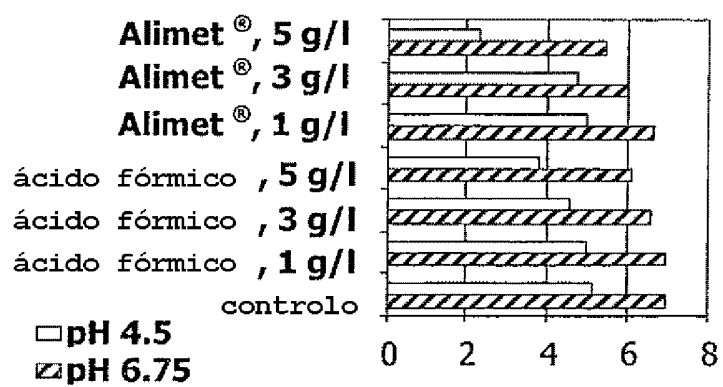


FIG. 4A

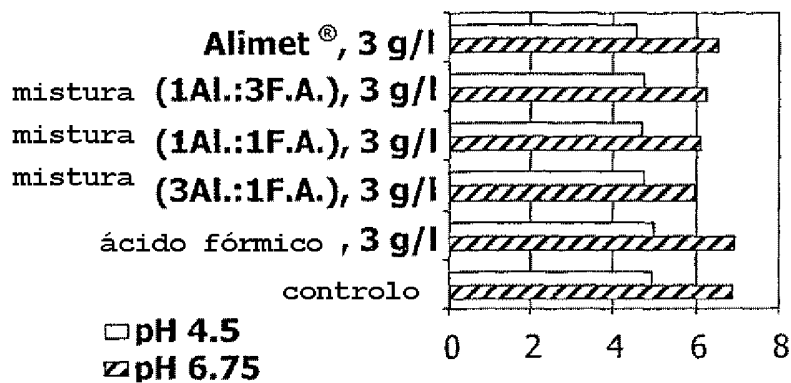


FIG. 4B

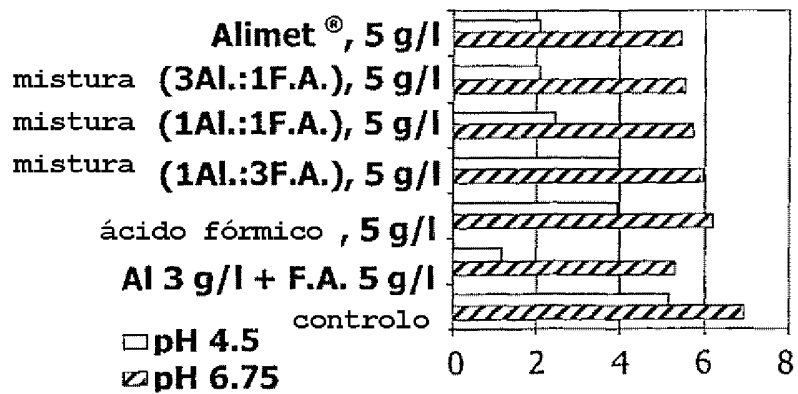


FIG. 5

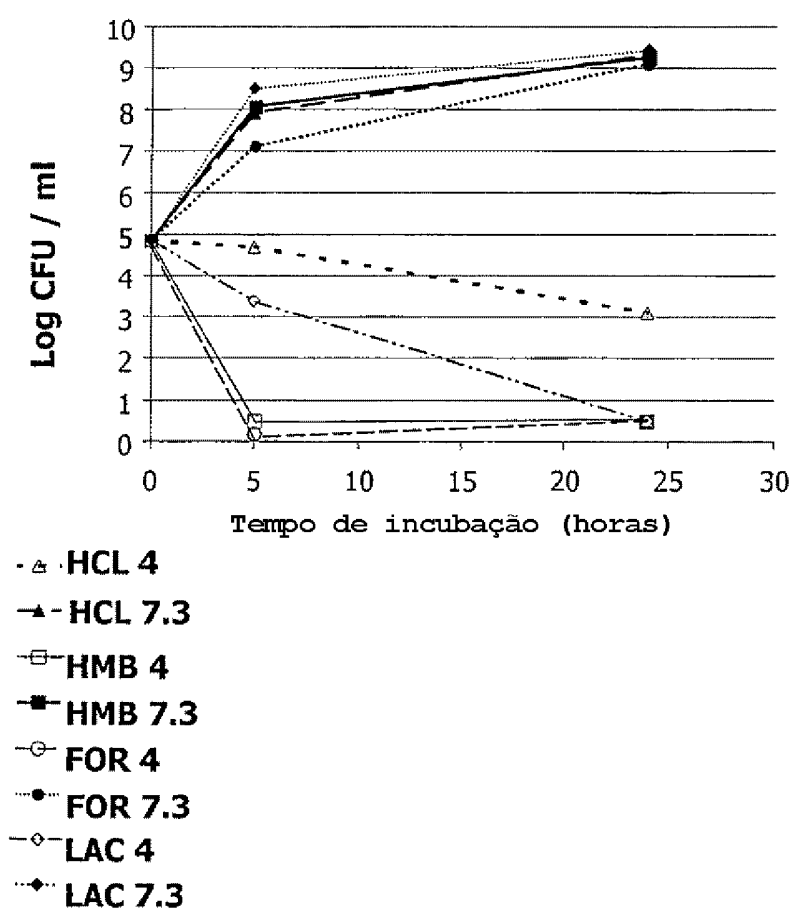


FIG. 6

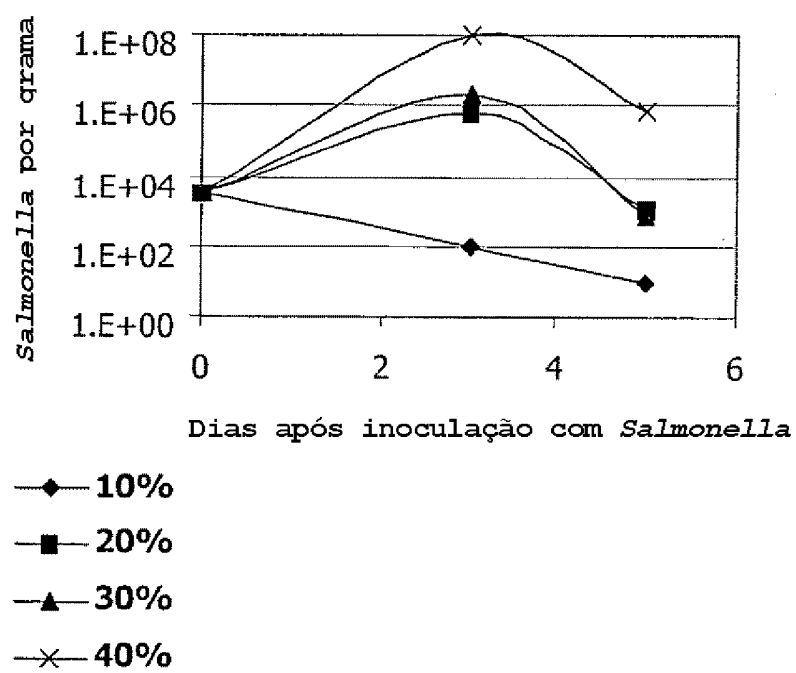


FIG. 7

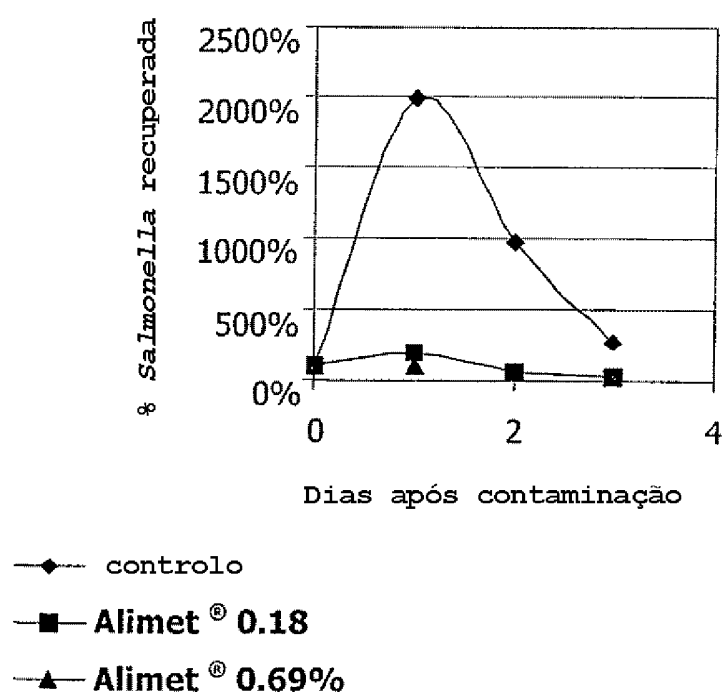


FIG. 8

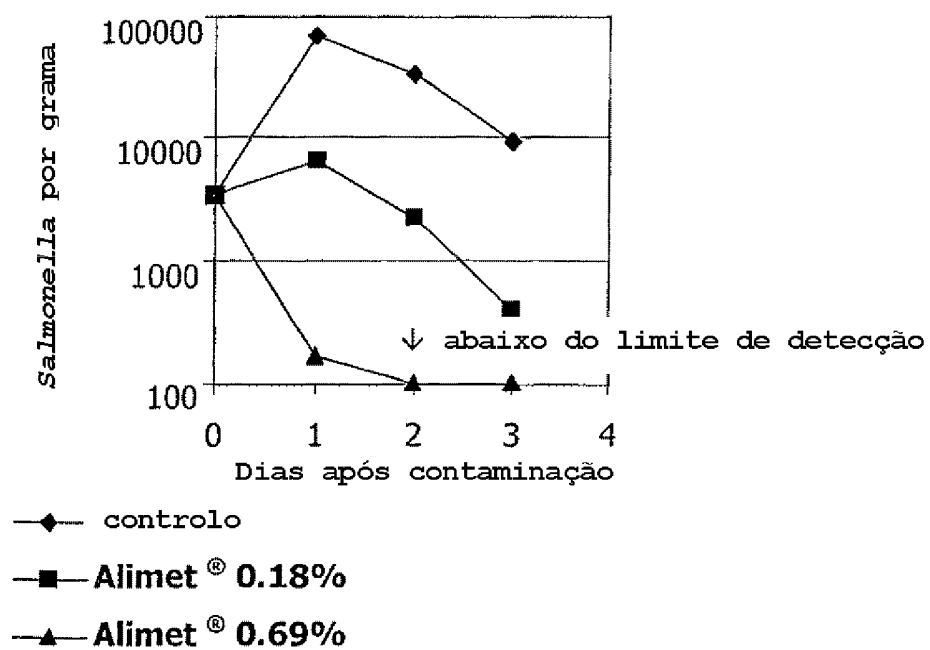


FIG. 9

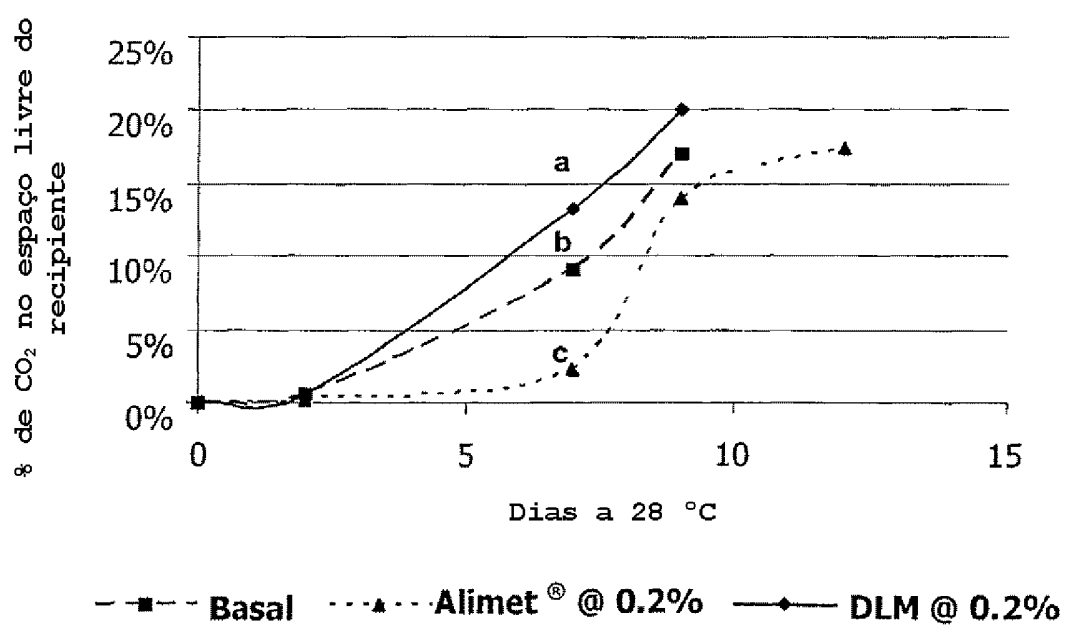




FIG. 10

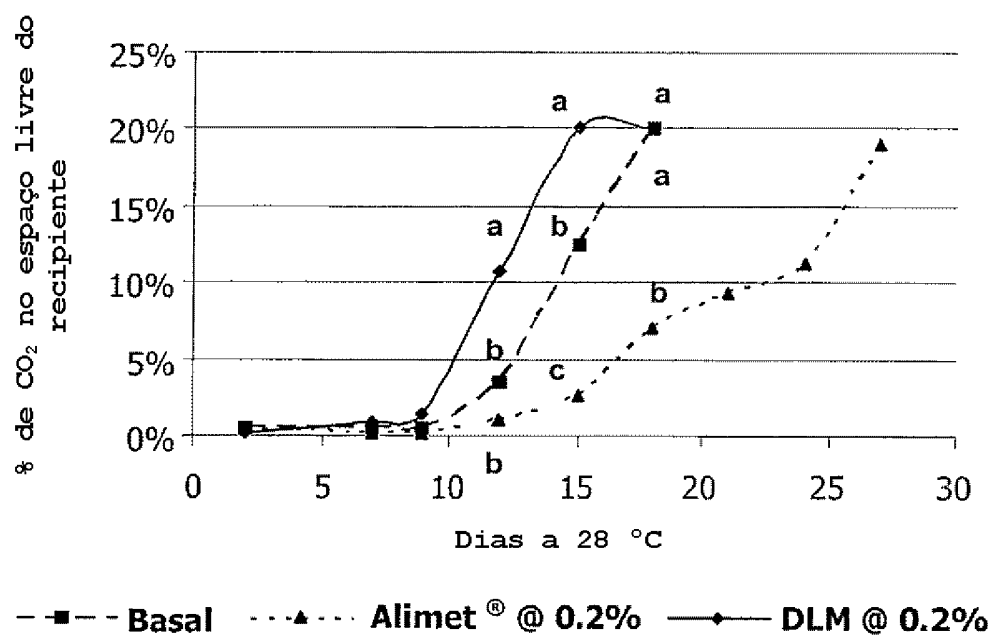


FIG. 11

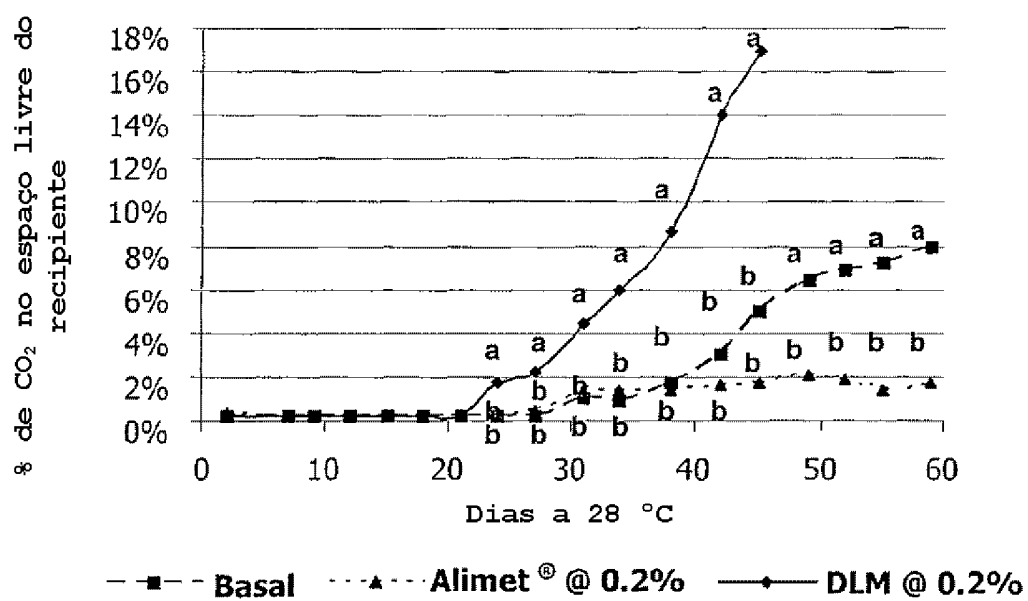


FIG. 12

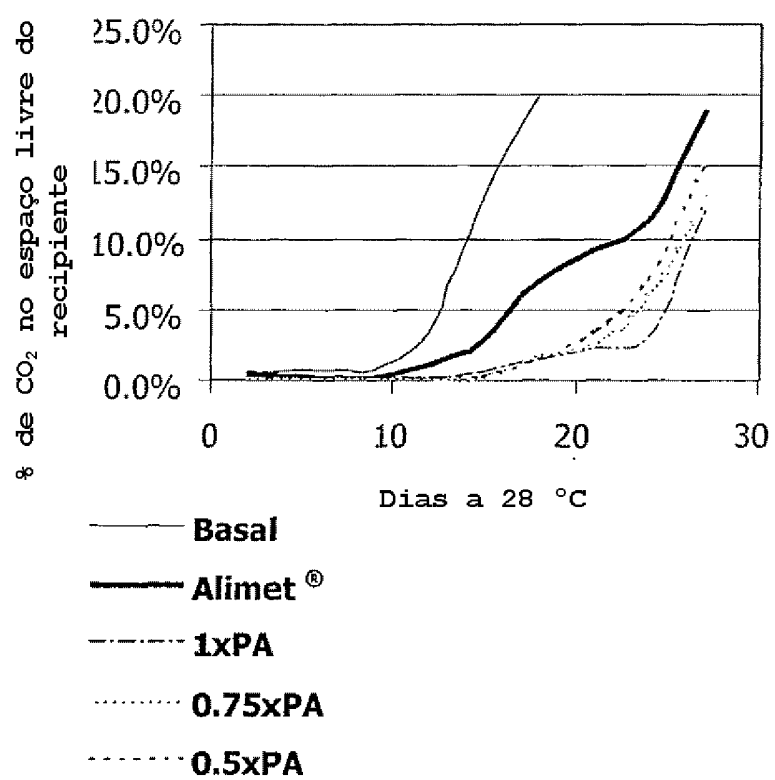


FIG. 13

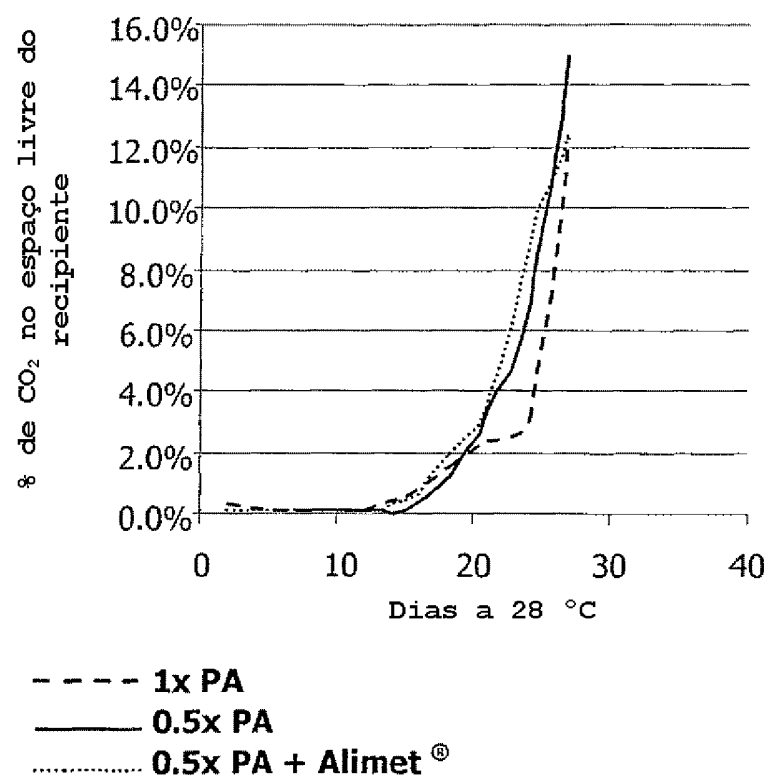


FIG. 14

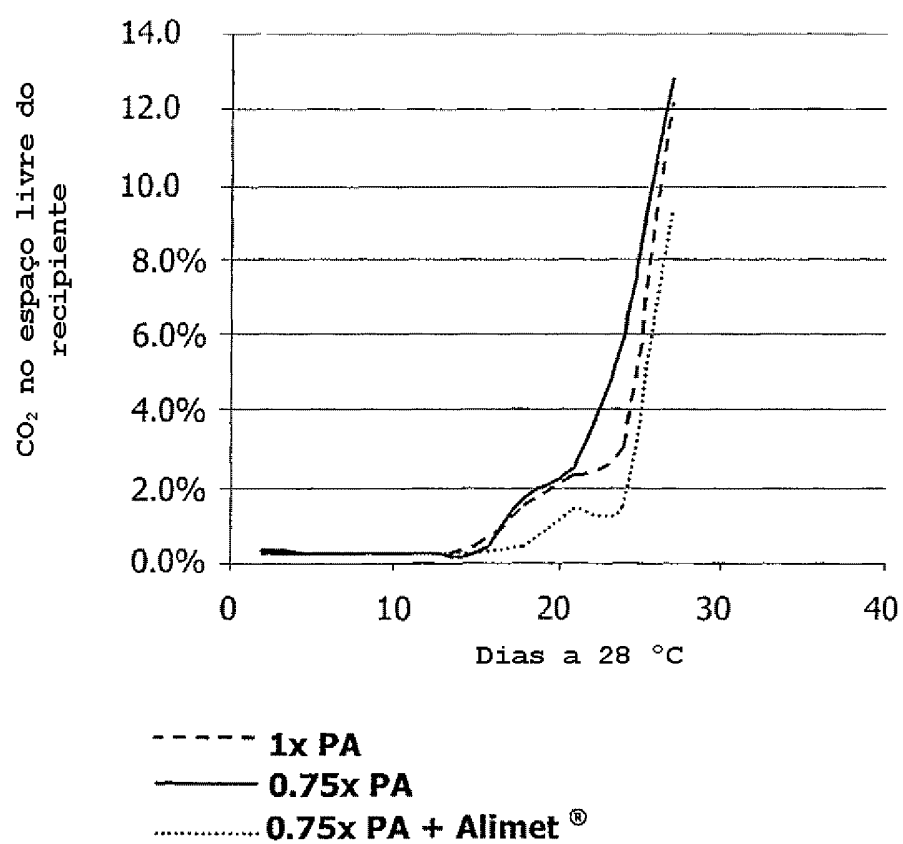


FIG. 15

