

COMPOSICIONES ANTIMICROBIANAS DE ÁCIDO ORGÁNICO

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención se refiere a una composición estable, que consiste en sustancias GRAS, para control microbiano, específicamente en procesos de fermentación.

ANTECEDENTE DE LA INVENCIÓN

[0002] Los ácidos carboxílicos orgánicos son conocidos generalmente por tener propiedades antimicrobianas. Trabajo reciente ha mostrado efecto sinérgico entre ácidos carboxílicos orgánicos y otros tipos de agentes antimicrobianos, tales como ácidos de lúpulo. Por ejemplo, la solicitud de EE.UU. 2004/0175480 describió que los lúpulos beta-ácidos eran más efectivos como agente antimicrobiano si estaban en combinación con ácido de calidad alimentaria, tal como ácido láctico, ácido acético, ácido propiónico, ácido cítrico, una fuente de iones de potasio y un antioxidante.

[0003] Los ácidos orgánicos antimicrobianos son generalmente solubles en agua en alta concentración, pero algunos de los agentes antimicrobianos de ácido orgánico no son solubles en agua o salados en la presencia de electrolito. Como un ejemplo, se sabe que los ácidos de lúpulo tienen solubilidad en agua limitada y las composiciones antimicrobianas de ácidos de lúpulo descritas en artes previos son bajas en activo incluso con el uso de solventes orgánicos tales como glicoles o agentes de suspensión.

[0004] Una forma de combinar los diferentes antimicrobianos es atomizar el agente antimicrobiano líquido en el ácido orgánico en polvo o sal, pero la composición resultante no es fácilmente dispersarle en agua. Aunque humedecer y/o emulsionar agentes puede formularse en la composición sólida, es más conveniente tener productos líquidos con alto contenido activo para manejo y uso. Los productos con alto contenido activo también ahorran costos en procesamiento, transporte y almacenamiento desde un punto de vista de sostenibilidad.

[0005] Se conoce que el tensioactivo puede ayudar a solubilizar material hidrofóbico en el agua. Los tensioactivos tales como aquellos descritos en las patentes de EE.UU. 5374614, 7655613 y 7846889 se utilizaron para formar micro emulsiones, un líquido

isotrópico termodinámicamente estable, de ingredientes solubles e insolubles en agua. Tales composiciones de micro emulsión que contienen ácidos orgánicos también se describieron en patentes de los EE.UU. 5294364, 6251844, 7030070 y 7642227 como líquidos de limpieza ácida. El contenido de ácido orgánico es bajo y los tensioactivos usados pueden estar prohibidos en las aplicaciones para comida o artículos en contacto con comida.

[0006] Se desea tener un solo producto con todos los componentes antimicrobianos sinérgicos en una forma concentrada estable con agua como el solvente. Se prefiere aún más que el producto antimicrobiano sea de poco interés en términos de requerimientos de inflamabilidad, corrosividad, toxicidad y regulatorio

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0007] La invención proporciona una composición antimicrobiana acuosa que comprende: (i) ácidos orgánicos solubles en agua o sus sales, (ii) agentes antimicrobianos con solubilidad en agua limitada, y (iii) tensioactivos.

[0008] Esta invención proporciona una composición antimicrobiana acuosa estable no peligrosa que comprende ácidos orgánicos solubles en agua y agentes antimicrobianos de solubilidad en agua limitada con alto contenido activo, preferiblemente mayor a 10%, más preferiblemente mayor a 20% y más preferiblemente mayor a 30% del peso total de la composición. Las composiciones se formulan con ingredientes GRAS (generalmente reconocido como seguro) que están autorizados a ser utilizados en comidas y bebidas, y las composiciones se clasifican como materiales no peligrosos en términos de inflamabilidad y corrosividad. Las composiciones son estables como líquido homogéneo durante más de 1 mes, preferiblemente más de 3 meses y más preferiblemente más de 6 meses a temperatura ambiente o inferior.

[0009] Las composiciones de acuerdo con la presente invención se diseñaron para funcionar como agentes antimicrobianos, preferiblemente para reducir o controlar la concentración de microorganismos indeseados en procesos de fermentación. Tales composiciones similares podrían usarse también para otros fines tales como antiparasitarios o como agentes de concentración de limpieza, desincrustantes y desinfectantes. Los componentes activos de la composición comprenden uno o más ácidos

orgánicos o sus sales, y uno o más agentes antimicrobianos de solubilidad en agua limitada, con un contenido activo total (ácido orgánico, más agente antimicrobiano) mayor a 5% en peso, preferiblemente mayor a 15% y más preferiblemente mayor a 25% con base en el peso total de la composición. Las composiciones también comprenden uno o más solubilizantes tensioactivos. Estos incluyen, mas no se limitan a, tensioactivos aniónicos, tensioactivos no iónicos, tensioactivos anfóteros, tensioactivos zwitteriónicos y tensioactivos catiónicos. Ingredientes adicionales tales como agente neutralizante, solvente, también pueden añadirse para aumentar el contenido activo total sin desestabilizar la composición. También pueden añadirse los agentes funcionales tales como los agentes quelantes, secuestrantes, inhibidor corrosivo, enzimas, agentes de modificación de la superficie, colorantes y perfumes.

[0010] Los ácidos orgánicos solubles en agua preferidos para usar en la invención se seleccionan de ácidos mono y policarboxílicos orgánicos solubles en agua con dos a ocho átomos de carbono en la molécula y opcionalmente sustituidos por uno o más grupos hidroxilo. Las clases adecuadas son ácidos alcanóicos, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos policarboxílicos de alquilo y ácidos policarboxílicos hidroxialquilo. Los que se prefieren en este documento son ácidos mono y policarboxílicos que tienen un valor pKa, relacionado a la primera etapa de disociación de menos de aproximadamente 6. Estos incluyen, por ejemplo, ácido acético, ácido adipico, ácido bencenosulfónico, ácido benzoico, ácido cítrico, ácido glucónico, ácido glutárico, ácido hidroxiacético, ácido láctico, ácido málico, ácido metanosulfónico, ácido oxálico, ácido propiónico, ácido salicílico, ácido succínico, ácido tartárico y mezclas de los mismos al igual que sus sales. Un ácido preferido es ácido cítrico o su sal. Para fines de esta invención el ácido de lúpulo no es un ácido orgánico.

[0011] El contenido de ácido orgánico soluble en agua va desde 5 a 70%, desde 5 a 60%, desde 5 a 50%, preferiblemente 15 a 60%, más preferiblemente 25 – 50% en peso dentro de la composición total.

[0012] Los agentes antimicrobianos adecuados de solubilidad limitada incluyen ácidos de lúpulo o nisina. El término “ácidos de lúpulo” como se usa en este documento incluye ácidos beta de lúpulo, ácidos alfa de lúpulo, sus productos isomerizados o derivatizados y sus sales. También incluye extractos de lúpulo tales como aquellos descritos en US

5286506. Las identidades químicas de ácidos de lúpulo alfa y beta incluyen cohumulonas, humulonas, adhumulonas, colupulonas, lupulonas y adlupulonas. Estas están todas incluidas en el término “ácidos de lúpulo” como se usa en este documento. Los ácidos de lúpulo se pueden preparar mediante extracción y purificación de lúpulos naturales o mediante síntesis química. Un agente antimicrobiano preferido es ácidos de lúpulo.

[0013] El componente antimicrobiano hidrofóbico, preferiblemente ácidos de lúpulo, contenidos activos están desde 0.05 hasta 15%, preferiblemente 0.1 a 10%, más preferiblemente 0.5 – 5% en peso dentro de la composición total.

[0014] Los agentes solubilizantes o emulsificantes del tensioactivo para componentes antimicrobianos de baja solubilidad en agua incluyen tensioactivos no iónicos, aniónicos, catiónicos, anfóteros y zwitteriónicos. Los tensioactivos descritos en las patentes de EE.UU. 846889, 7030070, 6251844 y 5294364 se incorporan aquí por referencia. Los tensioactivos preferidos son aquellos autorizados a usar como ingredientes de comida y farmacéuticos o en artículos con potencial de contacto con alimentos. Estos tensioactivos incluyen polisorbatos (ésteres de ácidos grasos de polioxietileno-sorbitán) tales como los Tweens (Croda Inc), mono o dialquil sulfosuccinatos tales como Aerosol OT (Cytec), poliglucósidos de alquilo tales como Glucopons (BASF) y sulfatos de alquilo. Los tensioactivos preferidos para usar en la invención incluyen polioxietileno (20) monooleato de sorbitán y poliglucósidos de alquilo.

[0015] La composición puede contener uno o más tensioactivos de un solo grupo o de diferentes grupos de tensioactivos. La cantidad de uno o más tensioactivos en las composiciones va desde 0.1 a 30%, preferiblemente 1 a 20%, más preferiblemente 2 – 15% en peso dentro de la composición total.

[0016] Una cantidad limitada de solvente orgánico o co-tensioactivos también puede usarse de modo que la cantidad de tensioactivo pueda reducirse. Los ejemplos son alcoholes grasos tales como metanol, etanol, propanol, butanol, glicoles o alcohol polihídrico de etilenglicol, propilenglicol, glicerol; ácidos grasos o diácidos tales como ácido butanóico, ácido adipico, ácido octanoico. Los co-tensioactivos preferidos incluyen etanol, propilenglicol y ácido adipico.

[0017] La composición puede contener uno o más co-tensioactivos o solventes orgánicos de un solo grupo o de diferentes tipos. La cantidad de uno o más co-tensioactivos o solventes orgánicos en la composición va desde 0.1 a 30%, preferiblemente 1 a 20%, más preferiblemente 2 – 10% en peso dentro de la composición.

[0018] El ácido orgánico puede neutralizarse total o parcialmente con álcali o hidróxido alcalinotérreo, hidróxido de amonio o aminas orgánicas. Los ejemplos son hidróxido de sodio, hidróxido de potasio y amoníaco. El grado de neutralización depende del tipo y la cantidad de ácidos orgánicos. Típicamente, la composición debe neutralizarse a pH sobre 2 para reducir la corrosividad del ácido orgánico, pero no más de pH 4 para retener el más alto contenido activo posible. Sin embargo, para alta estabilidad de la composición, se prefiere la neutralización a pH alcalino.

[0019] La composición se prefiere que sea formulada como microemulsión, una mezcla líquida isotrópica termodinámicamente estable de aceite y agua que contiene tensioactivo preferiblemente con un co-tensioactivo o solvente. El ácido orgánico primero se disuelve en agua y se neutraliza al pH deseado, y luego se mezcla con al menos un tensioactivo, al menos un co-tensioactivo y al menos un agente antimicrobiano de solubilidad en el agua limitada. Se prefiere que el agente antimicrobiano hidrofóbico se disuelva primero en al menos un tensioactivo y al menos un co-tensioactivo o al menos un solvente para hacer una pre-mezcla, que luego se diluye con solución acuosa de ácido orgánico neutralizado.

[0020] Se prefiere que todos los componentes de la composición antimicrobiana sean autorizados como ingredientes de comida o que les sea otorgado el estatus GRAS (generalmente reconocido como seguro) por la FDA. También se prefiere que la composición no sea peligrosa en términos de corrosividad e inflamabilidad.

[0021] Las composiciones proporcionan un tratamiento poderoso, no antibiótico, antimicrobiano. La composición puede usarse para reducir concentración de microorganismos indeseable, promover la propagación de microorganismos deseable, e incrementar la eficiencia de microorganismos deseable en un sistema acuoso.

[0022] En el método anterior, los microorganismos “indeseables” que se pretenden reducir son aquellos que compiten por nutrientes con los microorganismos deseados que promueven los procesos de fermentación deseados. Los microbios indeseados o no

deseados en la fermentación incluyen las bacterias que producen ácido láctico (LAB) y las bacterias que producen ácido acético de las cuales Lactobacillus y Acetobacter son representantes prominentes. Puede considerarse indeseable cualquier microbio que compita por el sustrato fermentable, negándosele al organismo de fermentación pretendido y reduciendo así rendimientos. En este sentido, el extracto de ácido de lúpulo y ácido orgánico empleado en el presente método no afecta perjudicialmente el crecimiento y viabilidad de microorganismos deseables que promueven la fermentación, sino que elimina o suprime el crecimiento de microorganismos indeseables que interfieren con el proceso de fermentación. Además, la eliminación o supresión de microorganismos indeseables tiene un efecto favorable en el crecimiento y viabilidad de microorganismos deseables.

[0023] El método para controlar la concentración de microorganismos indeseados en una solución acuosa empleada en un proceso de fermentación que comprende los pasos de: introducir un carbohidrato fermentable en una solución acuosa, introducir al menos una levadura en la solución acuosa, e introducir la composición que contiene (a) los ácidos orgánicos solubles en agua o sus sales, (b) los agentes antimicrobianos con solubilidad en agua limitada, y (c) los tensioactivos a la solución acuosa.

[0024] La composición se añade al sistema de fermentación con el fin de controlar la concentración de microorganismos indeseados de modo que la cantidad del ácido orgánico en el sistema de fermentación sea desde 12500 ppm hasta 100 ppm, desde 6250 hasta 100 ppm, o desde 4000 hasta 100 ppm, o desde 4000 hasta 200 ppm. Generalmente se usa al menos 100 ppm o al menos 200 ppm o al menos 300 ppm de ácido orgánico. La composición se añade al sistema de fermentación de modo que la cantidad del agente antimicrobiano con solubilidad en agua limitada en el sistema de fermentación va desde 0.5 ppm a 200 ppm, o desde 0.5 ppm a 150 ppm, o desde 2 a 150 ppm, o desde 2 a 100 ppm. Generalmente, la cantidad de ácidos de lúpulo usados es al menos 2 ppm o al menos 5 ppm.

EJEMPLOS

Ejemplo #1

[0025] Mezclar Tween 80 (polioxietileno (20) monooleato de sorbitán), 10.82 partes, etanol absoluto, 3.74 partes y ácido de lúpulo, sal de potasio (30% ácido activo), 3.15 partes en el orden descrito para dar un líquido homogéneo. En un recipiente separado, disolver ácido cítrico, anhidras 34.49 partes en agua desmineralizada 34.49 parte, y la solución fría se neutralizó entonces añadiendo hidróxido de amonio de 28-30% contenido de amoniaco, 6.02 partes. El ácido cítrico parcialmente neutralizado se añadió entonces a la fase orgánica que contiene ácidos de lúpulo, que resultan en un líquido isotrópico de aproximadamente 35% de agentes antimicrobianos combinados activos. La composición se encontró estable a 4 °C sin cristalización de sal de citrato y quedó tan homogénea por 1 mes a 50 °C. No se observó efecto negativo como agente antimicrobiano con la formulación.

Tabla 1. Composiciones de ácido cítrico y lúpulo (por ciento en peso)

Ejemplo #	1	2
Ácido cítrico, anhidro	34.49	37.84
D. agua	41.78	45.84
Etanol, 99.5%, absoluto	3.74	2.05
Tween 80	10.82	5.94
Hidróxido de amonio, 28-30% NH ₃	6.02	6.60
Ácido de LÚPULO, 30%	3.15	1.73
Estabilidad:		
F/T (- 20 °C)	Estable como líquido	Estable como líquido
4 °C (cristalización)	>46 días	>46 días
22 °C	>76 días	>76 días
32 °C	>70 días	>70 días
50 °C (separación de fase líquida)	30 días	37 días

Ejemplo #2

[0026] Se aplicó el mismo procedimiento que en el Ejemplo #1 con las cargas enumeradas en la Tabla 1 para dar una composición de 38% agentes antimicrobianos combinados activos. La composición se encontró estable para 4 °C y temperatura ambiente sin cristalización de sal de citrato y se mantuvo tan homogénea por 37 días a 50

°C (Tabla 1). De nuevo, no se observaron efectos adversos en propiedades antimicrobianas con la formulación.

Los ejemplos #3 a 11

[0027] Tres tensioactivos de estatus GRAS, esto es, Tween 80, Aerosol OT-70PG (Cytec), y alquilpoliglucósido de Triton BG-10 (Dow) o Glucocon 215 UP (BASF), se formularon en estos Ejemplos de acuerdo con las cargas enumeradas en la Tabla 2. El ácido cítrico primero se disolvió en agua y luego se neutralizó parcialmente con amoniaco. Los tensioactivos, Tween 80, Aerosol OT-70PG, Triton BG-10 o Glucocon 215 UP se añadieron como se indica, seguidos por ácidos de lúpulo y etanol. Después de mezclar a fondo, siempre se obtuvo un líquido homogéneo con vida útil mencionada en la Tabla 2.

Tabla 2. Composiciones de ácido cítrico y lúpulo (porcentaje en peso)

Ejemplo #	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ácido cítrico, anhidro	34.49	33.77	32.33	33.37	34.18	33.56	33.35	34.49	32.03
D. agua	41.78	40.90	39.15	40.41	41.38	40.64	40.40	41.78	38.99
Etanol, 99.5%, absoluto	4.15	4.19	3.86	3.98	4.13	4.07	4.16	4.30	3.34
Tween 80				11.62	10.16	2.72		10.25	11.82
Aerosol OT-70PG	4.94	1.48	10.86	1.75			1.47		
Triton BG-10	5.48	10.68	5.20		1.08	10.01			
Glucocon 215 UP							11.70		4.57
Aq. NH ₃ , 28-30%	6.02	5.90	5.65	5.83	5.97	5.86	5.83	6.02	5.62
Ácido de lúpulo, 30%	3.14	3.08	2.96	3.04	3.11	3.14	3.10	3.16	3.63
Estabilidad:									
F/T (- 20 °C)	líquido	líquido	líquido	líquido	líquido	líquido	estable	estable	estable
4 °C (cristalización), días	>43	>70	>43	>70	>70	>70	>56	>56	>36
22 °C, días	20 d	>70 d	20 d	>70 d	>70 d	>70 d	>56 d	>56 d	>36
50 °C (separación de fases), días	2	36	2	54	70	30	34	56	>36

Ejemplos 12 - 13

[0028] En estos ejemplos se usó hidróxido de potasio como agente neutralizante. Se siguió el mismo procedimiento que en los Ejemplos #3-10 con cargas por peso enumeradas en la Tabla 3. Los contenidos activos de agentes antimicrobianos se

incrementaron por encima de 40%, pero la vida útil se limitó. Se cree que la inestabilidad fue causada por los solubilizantes de tensioactivo lábil en medio ácido.

Ejemplos 14-16

[0029] En estos ejemplos el hidróxido de potasio se usó para neutralizar los ácidos hacia pH alcalino para alta estabilidad. Los co-tensioactivos alternativos o propileno y/o ácido adipico no inflamable también se usaron como se muestra en la Tabla 4 de estas composiciones. Se siguió el mismo procedimiento que los Ejemplos #3-10 con cargas en peso enumeradas en la Tabla 4. No se esperaba la hidrólisis de los tensioactivos usados, y no se observó desestabilización y poca decoloración de ácido de lúpulo durante el envejecimiento por más de 6 semanas a 4, 22 y 50°C.

Tabla 3. Composiciones de ácido cítrico y lúpulo (porcentaje en peso)

Ejemplo #	12	13
D. Agua	39.47	41.96
Aerosol OT-75 (en etanol)	3.78	2.87
Tween 80	5.27	2.81
Ácido cítrico, anhidro	39.39	41.47
45% KOH	8.50	9.00
30% Ácido isoalfa, Extracto	3.59	1.89
Estabilidad:		
F/T (- 20 °C)	Permanece como líquido	Permanece como líquido
4 °C	>2 meses	> 2 meses
22 °C	10 semanas	4 semanas
50 °C	< 24 horas	< 24 horas

Tabla 4. Composiciones alcalinas de ácido cítrico y lúpulo (porcentaje en peso)

Ejemplo #	14	15	16
Ácido cítrico	25.30	25.76	25.76
Ácido adipico	3.22	3.23	3.20
Hidróxido de potasio, 45%	53.90	54.78	54.80
Glucopon 215UP, 62%	11.80	10.40	10.40

Ácido de lúpulo, 30%	2.87	2.92	2.92
Etanol, 99.5%	2.91	2.91	
Propilenglicol			2.92
pH	8.80	8.88	9.13

Ejemplos 17-18

[0030] En estos ejemplos, se usó el etanol como solvente para disolver tanto el ácido de lúpulo como el ácido cítrico en agua (Tabla 6). Sin embargo, esta composición se considera inflamable debido a la presencia de una gran cantidad de solvente inflamable.

Tabla 6. Composiciones de ácido de lúpulo/cítrico en etanol/agua (porcentaje en peso)

Ejemplo #	17	18
Etanol, 99.5% absoluto	35.08	32.79
Ácido cítrico, anhidro	39.50	40.82
30% Ácido isoalfa, Extracto	3.60	1.66
D. Agua	21.82	24.53

Ejemplos 19-20

[0031] En estas muestras, se añadió propilenglicol para mitigar la inflamabilidad de las composiciones (Tabla 7). Pero el propilenglicol no es un buen solvente para el ácido cítrico, el contenido activo es limitado.

Tabla 7. Composiciones de ácido de lúpulo/cítrico en propilenglicol/etanol/agua (porcentaje en peso)

Ejemplo #	19	20
Etanol, 99.5% absoluto	10.90	10.90
Propilenglicol	45.18	42.50
Ácido cítrico, anhidro	22.93	24.80

30% Ácido isoalfa, Extracto	2.09	1.13
D. Agua	18.90	20.67

[0032] Ejemplo 21: Determinaciones MIC de composiciones de ácido cítrico/ácido de lúpulo

[0033] En los siguientes ejemplos, el extremo usado para medir niveles de actividad antimicrobiana se conoce como la concentración inhibitoria mínima, o MIC. Esta es la concentración más baja de una sustancia o sustancias que pueden alcanzar inhibición de crecimiento completa.

[0034] Se inocularon cinco mililitros de medio de crecimiento con el microbio de prueba adecuado y se incubaron con agitación durante la noche. Estos cultivos durante la noche (ON) se diluyeron 1:100 (100 µl de ON en 10 mL PBS). Se usaron y prepararon placas de microtitulación de 96 pocillos Corning dispensando 252 µl de medio en la columna 1 y 140 µl en las columnas 2-12. Luego, 28 µl de la formulación se dispensó en la columna 1 para alcanzar un 1:10 dilución y la más alta concentración de la composición a probar. La columna 1 se mezcló mediante pipeteado y las diluciones en serie dobles se llevaron a cabo a través de la placa (140 µl de medio + la composición transferida todas las veces). La columna 12 se usó como un control libre de composición, por lo tanto 140 µl de medio + la formulación de la columna 11 fue eliminado a los residuos. Finalmente, se añadió 5 µl de bacterias a cada pocillo, produciendo $\sim 5 \times 10^5$ cfu/ml. Se cubrieron las placas de 96 pocillos, selladas con parafilm e incubadas a la temperatura adecuada durante 18-24 horas. Los pocillos se evaluaron como positivo o negativo para crecimiento con base en un examen visual para pocillos turbios, con la turbidez siendo un indicador de crecimiento. La más baja concentración de antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento (por ejemplo, un pocillo claro) se designa por la concentración inhibitoria mínima.

Tabla 8. Valores MIC

Formulación	Ácido cítrico: Ácido de lúpulo	Microbio de prueba	Medios de crecimiento	MIC (ppm producto)
-------------	-----------------------------------	--------------------	-----------------------	--------------------

Ejemplo 1	40:1	L. plantarum	MRS Broth	781
Ejemplo 1	40:1	S. aureus	M9YG	781-3125
			TSB	391-1563
Ejemplo 1	40:1	B. subtilis	M9YG	781-1563
			TSB	781-3125
Ejemplo 2	80:1	L. plantarum	MRS Broth	781-1563
Ejemplo 11	30:1	L. plantarum	MRS Broth	1722
Ejemplo 14	30:1	L. plantarum	MRS Broth	2365
Ejemplo 16	30:1	L. plantarum	MRS Broth	781-1563