

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 476**

51 Int. Cl.:

A23L 3/3508 (2006.01)

A23L 3/3535 (2006.01)

A23L 3/3526 (2006.01)

A23L 3/358 (2006.01)

A23L 3/3463 (2006.01)

A01N 59/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2008 E 08754525 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **24.02.2010 EP 2155002**

54 Título: **Composiciones y procedimientos de conservación de alimentos**

30 Prioridad:

18.05.2007 US 930913 P

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

01.02.2013

73 Titular/es:

**SCIESENT, LLC (100.0%)
60 Audubon Road
Wakefield, MA 01880 , US**

72 Inventor/es:

CRUDDEN, JOSEPH, J.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 394 476 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones y procedimientos de conservación de alimentos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a nuevas composiciones bioactivas para la conservación de alimentos y piensos frescos, especialmente frutas, nueces, hortalizas, granos y similares. En particular se proporcionan nuevas soluciones ácidas de iones metálicos antimicrobianos que tienen niveles bajos de ión metálico bioactivo, solo o, preferentemente, en combinación adicional con uno o más tensioactivos capaces de interaccionar con las membranas de la pared celular de microorganismos, especialmente microbios patógenos. Se ha descubierto que estas composiciones bioactivas son especialmente adecuadas para destruir y/o combatir o inhibir el crecimiento y la proliferación de microorganismos, especialmente de hongos y/o bacterias, responsables de la rápida descomposición y el deterioro de los alimentos frescos.

Antecedentes de la invención

15 Se han buscado y empleado en la sociedad durante mucho tiempo materiales bioactivos para destruir o inhibir el crecimiento y/o la proliferación/propagación de bacterias, hongos y otros microorganismos. Su uso se remonta a hace siglos, si no miles de años. Las aplicaciones anteriores han variado de aplicaciones farmacéuticas o relacionadas con la salud a aplicaciones de desinfección y purificación y más. Las aplicaciones más recientes incluyen una multitud de usos, viéndose el mayor uso, en volumen, en la industria agrícola. Quizás uno de los primeros materiales bioactivos fue la plata metálica y, posteriormente, las sales de plata.

20 Aunque los primeros agentes bioactivos eran con mayor frecuencia metales y sales metálicas simples, la ciencia moderna y la síntesis química han permitido el desarrollo y la producción de agentes de síntesis, con más frecuencia agentes orgánicos y organometálicos, para aplicaciones antibacterianas, antifúngicas y otras similares. De hecho, para muchas aplicaciones, especialmente aplicaciones farmacéuticas, los genes orgánicos han eclipsado, en su mayor parte, el uso de agentes bioactivos inorgánicos. Aunque los materiales inorgánicos y organometálicos aún dominan una cuota de mercado significativa del negocio agroquímico, su uso está limitado debido a las preocupaciones sobre su seguridad y la salud, especialmente desde una perspectiva ambiental.

30 A pesar del gran éxito y la enorme cuota de mercado/volumen dominado por los agentes farmacéuticos orgánicos, antibacterianos y agroquímicos, estos también conllevan un coste y unas consecuencias. En todas las áreas de aplicaciones, ha surgido una tendencia notable y creciente: concretamente la manifestación y propagación de resistencia a tales agentes orgánicos en la mayoría, si no todos, de los microorganismos. Aunque esta resistencia no es universal ni completa, está creciendo e implica cada vez más agentes orgánicos. Además, a medida que crece su resistencia, también lo hace su virulencia aparente así como su capacidad para adaptarse rápidamente y manifestar resistencia a nuevos agentes bioactivos y combinaciones de los mismos. A este respecto, los inventores son conscientes de la creciente resistencia de bacterias, especialmente bacterias patógenas, a agentes farmacéuticos tradicionales y la posterior aparición de lo que normalmente se denominan bacterias multirresistentes: bacterias patógenas que muestran fuerte resistencia a agentes antibacterianos y farmacéuticos orgánicos tradicionales. Se ha visto la misma tendencia en la industria agroquímica en la que, por ejemplo, a pesar del gran revuelo y las expectativas tras la introducción de los fungicidas de estrobilurina en la mitad de los años 90, se encontró resistencia después de solamente un par de años de uso de ciertas aplicaciones.

40 Y, como consecuencia directa o indirecta de la aparición de bacterias multirresistentes y/o la creciente conciencia de la facilidad con la que las bacteria pueden propagarse en combinación con una preocupación creciente por enfermedades potencialmente pandémicas tales como SARS y la Gripe Aviar, nos hemos convertido en una población que está cada vez más preocupada por la higiene y la limpieza general. En consecuencia ha habido una enorme proliferación y un crecimiento exponencial del uso y de la aplicación generalizados e indiscriminados de detergentes y desinfectantes que contienen agentes antimicrobianos orgánicos así como en la producción, la comercialización y el uso de una multitud de productos para consumo que tienen uno o más agentes antimicrobianos incorporados en los mismos, todo en un intento de protegerse contra la exposición a bacterias y, especialmente, bacterias multirresistentes. Sin embargo, este uso indiscriminado de agentes orgánicos se ha visto acompañado de, o al menos presenta la posibilidad de, un aumento global de organismos resistentes a agentes antimicrobianos. Al erradicar los organismos más débiles, quedan los organismos más fuertes y, con frecuencia, los más perjudiciales.

50 Tales preocupaciones, sin embargo, no se limitan a nuestro entorno de vida, sino que también surgen con respecto a nuestro aporte alimenticio. Específicamente, aunque la resistencia es ciertamente muy preocupante, quizás una preocupación aún mayor sea el impacto humano y ambiental asociado con el uso generalizado de agentes antimicrobianos: no solamente orgánicos sino también inorgánicos, especialmente metales. Durante más de medio siglo hasta la fecha, ha aparecido cada vez más bibliografía científica que correlaciona la exposición a largo plazo (directa e indirecta) y el uso de agentes agroquímicos orgánicos con diversas enfermedades y consecuencias teratogénicas, mutagénicas y otras adversas para la salud en animales y, de forma más importante, la población humana. Quizás el momento decisivo de esta concienciación está representado por las protestas con respecto al uso de agentes pesticidas de DDT y similares en los años 60. Sin embargo, tales preocupaciones no se limitan a los

pesticidas orgánicos: de hecho, los metales pesados, aunque son extremadamente eficaces como agentes agroquímicos o como un componente de ellos, presentan problemas igualmente molestos.

5 En general, los agentes agroquímicos han estado durante mucho tiempo bajo estrecha vigilancia debido a la correlación conocida y creciente entre su uso y/o exposición y la aparición de defectos de nacimiento, cáncer y otras enfermedades, no solamente en seres humanos sino en general en plantas o animales. Existen multitud de vías de exposición siendo una de las principales vías de exposición suministros de agua que se han o pueden haberse contaminado con tales agentes agroquímicos debido a su solubilidad y/o la de sus productos secundarios y semividas largas. Otra preocupación de fuente de exposición es la inhalación de polvo que se ha levantado de los campos, de aerosoles desviados y/o partículas durante la pulverización aérea y el espolvoreo, respectivamente, y de exposición a la ropa de trabajadores que, por sí mismos, se han expuesto en los campos o durante la aplicación.

10 Aunque lo anterior presenta preocupaciones de exposición significativas, quizá la mayor vía de exposición, debido simplemente a que afecta a todas las personas independientemente de dónde se localicen, es la cadena alimentaria. Durante décadas hasta la fecha, se nos ha planteado el reto de limitar el consumo de ciertos pescados debido a la bioacumulación de metales pesados, especialmente mercurio. De forma similar, hemos visto que se han retirado del uso un agente agroquímico tras otro o se ha restringido su uso de forma mucho más estricta debido a la aparición de ciertas preocupaciones sobre la salud humana y una protesta pública conjunta. Por ejemplo, a finales de los años 80, se detuvo "voluntariamente" el uso de Alar, un agente agroquímico muy ampliamente usado y muy beneficioso, en manzanas debido a crecientes preocupaciones sobre la salud relacionadas con cantidades residuales del agente agroquímico y/o sus productos secundarios en las manzanas y en el zumo de manzana producido a partir de las manzanas tratadas. En consecuencia, los rendimientos de cultivo y, de forma más importante, el aspecto estético y el periodo de caducidad de los cultivos de manzanas descendieron. Han acaecido consecuencias similares a cada vez más agentes agroquímicos, poniendo más presión sobre los agentes agroquímicos restantes para soportar el peso, especialmente teniendo en cuenta que la humanidad pretende generar cada vez más cultivo a partir de un área de tierra dada.

25 Aunque hay una tendencia y un impulso crecientes para cultivar de forma orgánica y eliminar los agentes agroquímicos, tales opciones no son prácticas y, lo que es más importante, dan como resultado cultivos que tienen un periodo de caducidad más corto y, en muchos casos, no tienen un aspecto tan fresco ni apetitoso como los que se han beneficiado de agentes agroquímicos, durante el proceso de crecimiento o como un tratamiento antes de la cosecha/después de la cosecha. Adicionalmente, siendo la economía agrícola actual una economía global, transportándose en vuelo frutas y hortalizas por todo el mundo para permitir el disfrute durante todo el año de productos de temporada, hay una necesidad creciente de mejorar el periodo de caducidad y protegerse contra el deterioro. Además, y de forma quizás más importante, existe una preocupación cada vez mayor sobre la seguridad de nuestros alimentos y productos alimenticios: particularmente desde una perspectiva de enfermedades portadas por alimentos. En particular, varios incidentes significativos en los Estados Unidos en los que estaban implicadas espinacas y productos de hojas verdes contaminados con bacterias patógenas condujo a varias muertes y enfermedades graves así como la pérdida de cientos de millones de dólares en destrucción de cultivos y retiradas de productos. Tales preocupaciones no son solamente con respecto a alimentos y productos alimenticios cultivados de forma agrícola, sino que también se aplican a productos de alimentos y piensos basados en proteínas, incluyendo pescado, aves de corral, huevos, carnes y similares.

40 A la luz de lo anterior, resulta evidente que la industria agrícola, y particular la cadena de suministro alimentario, está ante un gran dilema, usar agentes agroquímicos antes de la cosecha y después de la cosecha para conservar y proteger los productos alimentarios de deterioro y contaminación bacteriana o proteger el ambiente y la cadena alimentaria de la acumulación de agentes agroquímicos y contaminación y resistencia de microorganismos. Con otros productos alimentarios, especialmente productos proteicos, existe de nuevo el deseo de un periodo de caducidad largo y una reducción del deterioro y contaminación bacteriana evitando a la vez o al menos minimizando cualquier contaminación ambiental y/o alimentaria con conservantes u otros agentes agroquímicos.

Por lo tanto, existe la necesidad de tratamientos antes de la cosecha para cultivos alimentarios que minimicen cualquier liberación o exposición de activos o agentes agroquímicos perjudiciales, especialmente cualquiera que pueda tender a bioacumularse, en el ambiente y/o a los que los aplican.

50 De forma similar, existe la necesidad de tratamientos posteriores a la cosecha para cultivos alimentarios que tengan riesgo mínimo de exposición para la salud humana y/o preocupaciones relacionadas con exposición.

De forma similar, existe una necesidad continuada de agentes conservantes de alimentos que pueden emplearse para inhibir el deterioro, especialmente el que surge de microorganismos, de alimentos y productos alimentarios, así como cultivos de piensos.

55 En particular, existe la necesidad de agentes antimicrobianos, antifúngicos, antibacterianos, etc. inorgánicos, que pueden usarse de forma universal, o casi, en cultivos alimentarios y productos sin preocupación, o desde luego con una menor preocupación, por contaminación ambiental y toxicidad.

De forma similar, existe la necesidad de agentes inorgánicos que sean estables y fáciles de usar y proporcionen buena eficacia a corto plazo y, preferentemente, a largo plazo, en comparación con muchos de los agentes orgánicos de corta vida actuales.

5 El documento US 2005/191394 A1 se refiere a una gente antimicrobiano y en particular a una composición de materia, un procedimiento para preparar y usar la composición de materia para tratamiento antimicrobiano, antibacteriano, antes de la cosecha y después de la cosecha de productos alimentarios para inhibir el crecimiento celular de organismos patógenos, indicadores y de deterioro conocidos que contaminen la cadena alimentaria humana. El documento WO 03/039766 A describe un nuevo procedimiento económico para situar un revestimiento antimicrobiano en materiales de envasado y para dispersiones poliméricas que contengan zeolitas antimicrobianas.

10 **Resumen de la invención**

De acuerdo con la presente invención se proporcionan composiciones bioactivas protectoras útiles en el tratamiento antes de la cosecha y después de la cosecha de productos alimentarios para inhibir el crecimiento celular de bacterias y mohos patógenos, indicadores y de deterioro conocidos, describiéndose dichas composiciones en la reivindicación 1.

15 El nivel del ión metálico antimicrobiano en la solución es preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 300 ppm, más preferentemente de 2 ppm a 100 ppm, más preferentemente de 5 a 50 ppm, en el caso de un ión metálico antimicrobiano único y preferentemente de aproximadamente 2 ppm a aproximadamente 500 ppm, más preferentemente de 5 ppm a 200 ppm, más preferentemente de 5 ppm a 150 ppm en el caso de múltiples iones metálicos. Estas composiciones tendrán un exceso molar de al menos 2x, preferentemente al menos un exceso molar de 5x del ácido en relación con el ión o los iones metálicos, y preferentemente un pH de 1,5 a 5, más preferentemente de 2 a 4. Cuando el ácido es distinto de un ácido mineral, el producto debería tener al menos un tensioactivo iónico, no iónico y/o anfotérico que influya en o interaccione con las membranas de la pared celular de microorganismos, especialmente microbios patógenos, o en el funcionamiento de las mismas.

25 Las composiciones bioactivas productoras de la presente invención pueden incluir adicionalmente sistemas aglutinantes, espesantes, agentes humectantes y/u otros tensioactivos que estén aprobados para consumo humano para aplicar y mantener mejor los productos en los productos alimentarios a los que se aplican. La aplicación puede ser por medio de, por ejemplo, pulverización o espolvoreo en el caso de aplicación antes de la cosecha o pulverización, inmersión, revestimiento, etc. en el caso de aplicación después de la cosecha. Además de la aplicación directa a los productos alimentarios, estas composiciones pueden también aplicarse al envasado y/o
30 empaquetado en el que los productos alimentarios se sitúan para almacenamiento, transporte y/o distribución o venta. Por ejemplo, pueden tratarse o saturarse materiales de envasado y empaquetamiento celulósicos y otros absorbentes líquidos con las composiciones protectoras. De forma similar, las composiciones bioactivas protectoras pueden congelarse o incorporarse en hielo que se usa como un material de envasado para los productos alimentarios.

35 De acuerdo con otra realización de la presente invención, se proporcionan materiales de envasado y empaquetamiento para productos alimentarios tratándose dichos materiales de envasado o empaquetamiento con o preparándose usando las composiciones bioactivas protectoras anteriormente mencionadas. Específicamente, se tratan o saturan materiales de envasado absorbentes y/o adsorbentes con las composiciones bioactivas protectoras para inhibir el deterioro y prolongar el periodo de caducidad de los productos alimentarios almacenados y/o enviados
40 en dicho envase o paquete. Además, y como alternativa, el envasado puede ser hielo, al menos una parte del cual se prepara a partir de la composición bioactiva protectora.

De acuerdo con otra realización más de la presente invención, se proporciona un procedimiento para conservar alimentos y/o retardar la aparición de deterioro, como se describe en la reivindicación 15.

Descripción detallada

45 La presente invención abarca muchas realizaciones diferentes, como se ha expuesto anteriormente, todas las cuales tienen un grado significativo de características y preparación comunes. Fundamentalmente, la presente invención se centra en el uso de una composición bioactiva protectora que comprende una o más fuentes de iones metálicos antimicrobianos, un ácido y, opcionalmente, aunque preferentemente, uno o más tensioactivos, especialmente tensioactivos que afectan a y/o interaccionan con paredes celulares o membranas de microorganismos,
50 especialmente microbios patógenos. Se ha descubierto que estas composiciones, solas o en combinación con formulaciones y activos agroquímicos bioactivos convencionales, manifiestan bioeficacia amplia y sorprendentemente eficaz así como sinérgica.

La composición bioactiva protectora puede existir como material sólido, en esencia un polvo para espolvoreo, en lo sucesivo denominado con frecuencia la "composición ácida bioactiva", o como un líquido, en lo sucesivo denominada con frecuencia la "solución ácida bioactiva" y denominada en ocasiones de forma conjunta "solución o
55 composición ácida bioactiva". Como se usa en el presente documento, el término "bioactivo" pretende incluir agentes que destruyan o inhiban o prevengan el crecimiento y/o la proliferación de bacterias, hongos, virus y protistas de tipo fúngico, vegetal y stramenopiles que se asocian con enfermedades portadas por los alimentos y/o son responsables

del deterioro y degradación visual de cultivos alimentarios, incluyendo, pero sin limitación, frutas y hortalizas. Finalmente, las expresiones “alimento” y “productos alimentarios” pretenden abarcar e incluir todos los alimentos, productos alimentarios, piensos y productos de piensos y similares incluyendo frutas, hortalizas, nueces, huevos, pescado, aves de corral, carnes y similares.

- 5 Los ácidos que pueden usarse para preparar las composiciones bioactivas protectoras de la presente invención son sólidos o líquidos en su estado natural y son fácilmente solubles o se disuelven en o son miscibles con agua o un disolvente a base de agua. Como alternativa, también se contempla que la composición bioactiva protectora puede ser un aceite u otro sistema basado en disolvente no acuoso o lipófilo. Aquí, los componentes de la composición bioactiva protectora deben ser solubles en o miscibles con el aceite seleccionado u otro disolvente no acuoso o lipófilo o la solución ácida bioactiva acuosa o basada en agua debe combinarse con el aceite u otro disolvente no acuoso o lipófilo para formar una emulsión o suspensión.

15 Ácidos a modo de ejemplo incluyen los ácidos orgánicos, especialmente los ácidos carboxílicos tales como ácido cítrico, ácido valérico, ácido itacónico, ácido acético, ácido citracónico, ácido láctico, ácido málico, ácido succínico, ácido aldárico, ácido malónico, ácido propiónico, ácido malónico, ácido maleico, ácido salicílico, ácido glutárico, ácidos tartáricos, ácido benzoico y similares, así como los ácidos minerales tales como ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido bórico y similares. Se prefieren ácidos más débiles o moderados tales como ácidos aldárico, cítrico, málico y láctico en lugar de los ácidos minerales de moderados a fuertes como ácidos bórico y fosfórico. Sin embargo, pueden usarse ácidos fuertes, especialmente ácidos minerales fuertes como ácido sulfúrico o nítrico; sin embargo, dependiendo de la fuerza del ácido, puede ser preferible tamponar el ácido para evitar problemas de manipulación, uso y/o consumo. Esto es particularmente importante para composiciones bioactivas protectoras antes de la cosecha debido a que la aplicación de la composición a las plantas puede dañar o matar a la planta. También es importante para aplicaciones antes y después de la cosecha debido a posibles preocupaciones sobre la salud asociadas con la manipulación de alimentos y productos alimentarios tratados y el consumo de los mismos. Por lo tanto, aunque es eficaz, es más preferible evitar ácidos minerales y ácidos fuertes y, en su lugar, emplear ácidos carboxílicos y otros ácidos débiles. Adicionalmente, aunque algunos ácidos adecuados quedan fuera de este intervalo, es deseable que la pKa (en agua a 25 °C) del ácido sea mayor de 0, preferentemente mayor de 1, más preferentemente mayor de 1,5.

20 Como se ha indicado, la acidez es crítica para la eficacia de las composiciones bioactivas protectoras de la presente invención. El pH de las composiciones bioactivas protectoras de la presente invención será menor de 6, preferentemente de 1,5 a 5 y más preferentemente de 2 a 4, más preferentemente mayor de 2. En el caso de la evaluación o confirmación del pH de la composición ácida bioactiva sólida de acuerdo con la presente invención, la composición bioactiva se disuelve en primer lugar en agua a una concentración equivalente a la que se aplicaría en uso, y se mide el pH.

35 El segundo aspecto crítico de la concentración de ácido se refiere a la equivalencia molar en exceso de ácido para los iones metálicos antimicrobianos presentes en las composiciones bioactivas protectoras. Como mínimo, debe haber un exceso molar 2 veces, aunque preferentemente hay un exceso molar de ácido de al menos 5 veces, y más preferentemente al menos 10 veces. Estos niveles normalmente se consiguen formulando soluciones ácidas bioactivas por las que la concentración de ácido en el estado diluido final de la composición bioactiva es del 0,01 % al 10 %, preferentemente del 0,1 % al 4 % en peso de la solución. También pueden usarse concentraciones más altas, por ejemplo, hasta el 20 % o más, siempre que el alimento, producto alimentario u otro sustrato al que se deba aplicar la composición bioactiva no se vea afectado de forma adversa por el mayor contenido de ácido y/o el ácido sea un ácido débil o débil moderado.

45 El segundo componente crítico de las composiciones bioactivas protectoras es el ion metálico antimicrobiano, más acertadamente su fuente de ión metálico. Los iones metálicos adecuados se seleccionan del grupo que consiste en iones metálicos de transición antimicrobianos e iones bajos que han mostrado bioeficacia antimicrobiana. Se seleccionan iones metálicos preferidos del grupo que consiste en plata, cobre, zinc, estaño, hierro, oro o iones de hierro o combinaciones de dos o más cualesquiera de los anteriores. Más preferentemente, los iones metálicos se seleccionan del grupo que consiste en iones de plata, cobre y zinc y combinaciones de dos cualesquiera o los tres. Son especialmente beneficiosas y se prefieren composiciones bioactivas protectoras en las que están presentes al menos dos y preferentemente los tres de estos iones preferidos. Cuando están presentes múltiples iones metálicos antimicrobianos, cada uno estará presente en una cantidad molar del 3 al 97 por ciento, preferentemente del 9 al 91 por ciento, más preferentemente del 20 al 80 por ciento. En su realización preferida, en la que están presentes múltiples iones metálicos, estos estarán presentes en una cantidad igual, no estando ningún ion metálico en más de 20 veces, más preferentemente no más de 10 veces la de cualquier otro ión metálico. Se han descubierto resultados especialmente buenos cuando cada ión metálico antimicrobiano está presente en una cantidad igual, en peso.

60 El ión metálico se añade a la solución ácida o, según sea apropiado, el ácido, en forma de un compuesto fuente, sal o complejo que libere fácilmente los iones o se disocie de otro modo en la solución ácida o cuando la fuente y el ácido se disuelven en un disolvente, especialmente agua o un disolvente a base de agua. Sales a modo de ejemplo y compuestos organometálicos que pueden actuar de forma adecuada como las fuentes de iones incluyen los óxidos, sulfuros, carbonatos, nitratos, fosfatos, dihidrógeno fosfatos, sulfatos, oxalatos, quinolinolatos, tiosulfatos, sulfonatos, ftalatos, hidróxidos, glicolatos y similares respectivos de los metales antimicrobianos así como las sales

de ácido carboxílico de los mismos, especialmente los carboxilatos simples, tales como los citratos, benzoatos, acetatos, lactatos, etc. de dichos metales antimicrobianos. Otras sales tales como las sales de haluro y sales de haluro sustituidas, tales como los haluros, hexafluoroantimonatos, tetrafluoroboratos y percloratos de dichos metales antimicrobianos pueden usarse aunque son menos deseables puesto que tienden a tener solubilidad lenta y/o escasa, especialmente en agua. Las fuentes de iones metálicos específicas incluyen, pero ciertamente sin limitación, nitrato de plata, óxido de plata, acetato de plata, citrato de plata, óxido cúprico, hidróxido de cobre, óxido cuproso, oxiclورو de cobre, acetato cúprico, quinolinolato de cobre, citrato de cobre, óxido de zinc, citrato de zinc y similares.

También se ha descubierto sorprendentemente que ciertos complejos inorgánicos también pueden actuar como la fuente de iones metálicos. Específicamente, pueden usarse agentes antimicrobianos de tipo de intercambio iónico y agentes antimicrobianos de vidrio soluble cuando la matriz transportadora de estos materiales sea soluble en el ácido o ácido diluido. Por ejemplo, se ha descubierto que las zeolitas son fácilmente solubles en ácido cítrico concentrado. Aquí se añade la fuente o las fuentes de iones metálicos al ácido con mezcla hasta que se disuelvan las partículas. También se contempla que estas fuentes de iones metálicos pueden disolverse solo parcialmente para posibilitar una fuente a más largo plazo del ión metálico antimicrobiano. Aunque estas fuentes de iones tienden a disolverse en el ácido diluido, para acelerar y/o potenciar la disolución de la fuente de ión metálico, es preferible disolverlas en una solución ácida concentrada, preferentemente una de concentración de aproximadamente el 40 % al 80 %.

Los agentes de tipo intercambio iónico adecuados incluyen, pero sin limitación, aluminosilicatos, zeolitas, hidroxiapatita y fosfatos de circonio, todos los cuales están disponibles en el mercado y/o se describen completamente en la bibliografía de patentes. Por ejemplo, se describen partículas de hidroxiapatita que contienen iones metálicos antimicrobianos en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 5.009.898 y 5.268.174; se describen fosfatos de circonio que contienen iones metálicos antimicrobianos en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 4.025.608; 4.059.679; 5.296.238; 5.441.717 y 5.405.644, así como en el Journal of Antibacterial and Antifungal Agents, Vol. 22, N° 10, págs. 595-601, 1994; y se describen zeolitas y aluminosilicatos que contienen iones metálicos antimicrobianos en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 4.911.898; 4.911.899; 4.938.955; 4.938.958; 4.906.464 y 4.775.585. Los vidrios solubles adecuados incluyen los que se describen en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.470.585.

Aunque pueden usarse fuentes de iones metálicos individuales, también es deseable usar combinaciones de fuentes de iones metálicos para proporcionar una mezcla de iones metálicos. En ciertos casos, una fuente única puede proporcionar múltiples iones metálicos. Por ejemplo, las fuentes de iones metálicos de tipo intercambio iónico preferidas incluyen AgION AJ10D que contiene iones tanto de plata como de zinc y AgION AC10D que incluye iones tanto de plata como de cobre. Más preferentemente, las fuentes de iones metálicos son las sales y compuestos fácilmente solubles, como se ha mencionado anteriormente, y más preferentemente la combinación de tales compuestos por la que se preparan soluciones que tengan concentraciones iguales o relativamente iguales de cada ión de plata, cobre y zinc. Las combinaciones adecuadas incluyen combinaciones de citrato de plata, citrato de cobre y citrato de zinc así como combinaciones de nitrato de plata, sulfato de cobre y óxido de zinc.

La cantidad de la fuente de iones metálicos antimicrobianos para incorporar en la solución ácida o, según sea apropiado, para combinar con el ácido es la que sea suficiente para proporcionar una concentración de 1 ppm a 500 ppm, preferentemente de aproximadamente 1 ppm a aproximadamente 300 ppm, más preferentemente de 2 ppm a 200 ppm, más preferentemente de aproximadamente 5 a 50 ppm de cada ión metálico antimicrobiano, en la solución ácida bioactiva o composición ácida bioactiva a su concentración diluida de uso final. Cuando se usan múltiples iones metálicos y/o múltiples fuentes de iones metálicos para proporcionar combinaciones de iones metálicos, la concentración total de los iones metálicos en las soluciones debería ser de 2 ppm a 1000 ppm, preferentemente de aproximadamente 2 ppm a aproximadamente 500 ppm, más preferentemente de 5 ppm a 200 ppm, más preferentemente de 5 ppm a 150 ppm, en la solución ácida bioactiva o composición ácida bioactiva a su concentración diluida de uso final. Por supuesto podrían usarse niveles mayores pero no es necesario para proporcionar bioeficacia adecuada y, lo que es más importante, tal uso mayor entra en conflicto con la intención deseada de minimizar la adición de metales al ambiente. Por lo tanto, para conseguir dicho objetivo, es preferible usar la cantidad mínima, o casi, posible para la aplicación deseada.

En aplicaciones antes de la cosecha, la fitotoxicidad es una preocupación especial. Por lo tanto, de acuerdo con las aplicaciones agrícolas y hortícolas de la presente invención, el nivel de los metales debería ser menor del que provocaría de otro modo fitotoxicidad. Más preferentemente, como se ha indicado anteriormente, el objetivo es usar un nivel tan bajo de iones metálicos como sea posible razonablemente pero continuar proporcionando los beneficios deseados, especialmente propiedades fungicidas, protisticidas y/o antimicrobianas. Esta preocupación es especialmente pertinente para las composiciones bioactivas protectoras que contienen cobre solo o en combinación con uno o más de los otros iones metálicos antimicrobianos y más especialmente, cuando la solución o composición ácida bioactiva debe contener o usarse junto con otro material de cobre o a base de cobre. A este respecto, debería observarse que las limitaciones anteriormente mencionadas de los iones metálicos antimicrobianos se refieren solamente a los iones metálicos antimicrobianos a los que contribuyen la o las fuentes de iones metálicos antimicrobianos asociadas con la solución ácida bioactiva o composición ácida bioactiva y no al cobre o cualquier otro metal o ión metálico antimicrobiano al que puedan contribuir otros compuestos o materiales para usar junto con

o en combinación con las soluciones ácidas bioactivas o composiciones ácidas bioactivas.

Opcionalmente, aunque preferentemente, las composiciones bioactivas protectoras de la presente invención incluyen uno o más tensioactivos, especialmente tensioactivos solubles en agua. Aunque se han conseguido buenos resultados en soluciones ácidas bioactivas ácidas débiles y moderadas sin los tensioactivos, el uso del tensioactivo debería preferirse y generalmente se prefiere con tales ácidos. Además, aunque ciertos ácidos fuertes y muy fuertes, especialmente ácidos minerales, no aseguran la necesidad de tensioactivos, por ejemplo, ácido fosfórico, es especialmente deseable, y en algunos casos necesario, por ejemplo, cuando se desea no solamente bioeficacia a corto plazo, emplear uno o más tensioactivos. Son tensioactivos especialmente preferidos los que afectan a o interaccionan con paredes celulares o membranas de microorganismos, especialmente microbios patógenos, o su función. Los tensioactivos adecuados incluyen tensioactivos aniónicos, catiónicos, no iónicos y anfotéricos (por ejemplo, zwitteriónicos), especialmente los que son solubles en agua o muestran solubilidad en agua relativamente buena. Preferentemente los tensioactivos son tensioactivos aniónicos, no iónicos y/o anfotéricos tales como los sulfonatos, sulfatos, sulfosuccinatos, sarcosinatos, mono y diglicéridos, óxidos de amina, éter carboxilatos, betaínas, sulfobetaínas, glicinatos y similares. Generalmente, los tensioactivos catiónicos y los no iónicos que tienen unidades de polialquiléter, especialmente unidades de óxido de polietileno, con grados de polimerización de la unidad de alquilen éter de más de aproximadamente 6 no muestran el mismo nivel de eficacia al proporcionar sinergia con las composiciones bioactivas que los otros tensioactivos. No obstante, tales tensioactivos pueden usarse en combinación con tensioactivos eficaces siempre que no limiten materialmente o reduzcan la bioeficacia de las composiciones.

En general, el tensioactivo estará presente en una cantidad del 0,001 % al 3 %, preferentemente de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 0,5 %, en peso basándose en el peso total de la composición bioactiva protectora. Aunque podrían usarse cargas mayores, no es necesario manifestar la sinergia deseada en bioeficacia. De forma similar, aunque podrían usarse cargas menores, no es probable que se vea manifestación de cualquier actuación sinérgica o potenciada debida al tensioactivo. Generalmente, cuando el tensioactivo es de naturaleza básica o se hidroliza en agua para formar una solución básica, la cantidad debería minimizarse y/o la cantidad de ácido debería aumentarse para evitar demasiada neutralización de la solución ácida bioactiva.

Tensioactivos aniónicos a modo de ejemplo y clases de tensioactivos aniónicos adecuados para su uso en la práctica de la presente invención incluyen: alcohol sulfatos; alcohol éter sulfatos; alquilaril éter sulfatos; alquilaril sulfonatos tales como alquilbenceno sulfonatos y alquilnaftalenos sulfonatos y sales de los mismos; alquil sulfonatos; mono o di fosfato ésteres de alcoholes de alquilo polialcoxilado o alquilfenoles; mono o di sulfosuccinato ésteres de alcanos C_{12} a C_{15} o alcanos C_{12} a C_{15} polialcoxilados; alcohol éter carboxilatos; éter carboxilatos fenólicos; ésteres ácidos polibásicos de polioxialquilen glicoles etoxilados consistentes en oxibutileno o el resto de tetrahidrofurano; sulfoalquilamidas y sales de las mismas tales como sal sódica de N-metil-N-oleoiltaurato; polialquilen alquilfenol carboxilatos; productos de condensación de polialquilen alcohol carboxilatos anhídrido succínico de alquenilo/alquil poliglicósido; alquil éter sulfatos; naftaleno sulfonatos; condensados de naftaleno formaldehído; alquil sulfonamidas; poliésteres alifáticos sulfonados; ésteres de sulfato de estirilfenil alcoxilatos; y ésteres de sulfonato de estirilfenil alcoxilatos y sus sales correspondientes de sodio, potasio, calcio, magnesio, zinc, amonio, alquilamonio, dietanolamonio o trietanolamonio; sales de ácido ligninsulfónico tales como la sal de sodio, potasio, magnesio, calcio o amonio; poliariifenol polialcoxiéter sulfatos y poliariifenol polialcoxiéter fosfatos; y alquil fenol etoxilatos sulfatados y alquil fenol etoxilatos fosfatados; lauril sulfato sódico; lauril éter sulfato sódico; lauril sulfato de amonio; lauril éter sulfato de amonio; metil cocoil taurato sódico; lauroil sarcosinato sódico; cocoil sarcosinato sódico; colágeno hidrolizado de coco potásico; lauril sulfato de TEA (trietanolamina); lauril éter sulfato de TEA (trietanolamina); lauril o cocoil sarcosina; oleamida sulfosuccinato disódico; lauril éter sulfosuccinato disódico; dioctil sulfosuccinato disódico; sal sódica de N-metil-N-oleoiltaurato; tristirilfenol sulfato; lignina sulfonato etoxilado; Nonilfenol fosfato éster etoxilado; alquilbenceno sulfonato de calcio; tridecilaalcohol fosfato éster etoxilado; dialquil sulfosuccinatos; ácidos perfluoro (C_6 - C_{18}) alquil fosfónicos; ácidos perfluoro (C_6 - C_{18}) alquil-fosfónicos; perfluoro (C_3 - C_{20}) alquil ésteres de ácidos carboxílicos; diglucamidas de ácido alquenil succínico; alcoxilatos de ácido alquenil succínico; dialquil sulfosuccinatos sódicos; y alquilpoliglicósidos de ácido alquenil succínico.

Tensioactivos anfotéricos y catiónicos a modo de ejemplo incluyen alquilpoliglicósidos; betaínas; sulfobetaínas; glicinatos; alcanolamidas de ácidos grasos C_8 a C_{18} y amino polialcoxilatos grasos C_8 a C_{18} ; cloruros de alquildimetilbencilamonio C_{10} a C_{18} ; ácidos alquildimetilaminoacéticos de coco; ésteres de fosfato de aminopolialcoxilatos grasos C_8 a C_{18} ; alquilpoliglicósidos (APG) obtenibles de una reacción de Fischer catalizada por ácido de almidón o jarabes de glucosa con alcoholes grasos, en particular, alcoholes C_8 a C_{18} , especialmente los alquilpoliglicósidos C_8 a C_{10} y C_{12} a C_{14} que tengan un grado de polimerización de 1,3 a 1,6, en particular 1,4 ó 1,5.

Tensioactivos no iónicos a modo de ejemplo y clases de tensioactivos no iónicos incluyen: poliariifenol polietoxi éteres; polialquilfenol polietoxi éteres; derivados de poliglicol éter de ácidos grasos saturados; derivados de poliglicol éter de ácidos grasos insaturados; derivados de poliglicol éter de alcoholes alifáticos; derivados de poliglicol éter de alcoholes cicloalifáticos; ésteres de ácidos grasos de polioxietilen sorbitán; aceites vegetales alcoxilados; dioles acetilénicos alcoxilados; alquilfenoles polialcoxilados; alcoxilatos de ácidos grasos; sorbitán alcoxilatos; sorbitol ésteres; alquil o alquenil poliglicósidos C_8 a C_{22} ; polialcoxi estiriliril éteres; óxidos de alquilamina; éteres de copolímeros en bloque; glicérido graso polialcoxilado; polialquilen glicol éteres; poliésteres aromáticos o alifáticos lineales; órgano siliconas; poliariifenoles; alcoxilatos de sorbitol éster; y mono y diésteres de etilenglicol y mezclas

de los mismos; tristirilfenol etoxilado; alcohol graso etoxilado; lauril alcohol etoxilado; aceite de ricino etoxilado; y nonilfenol etoxilado; alcoholes, aminas o ácidos alcoxilados, mezclas de los mismos así como mezclas de los mismos con diluyentes y vehículos sólidos, en particular clatratos de los mismos con urea. Los alcoholes, aminas o ácidos alcoxilados se basan preferentemente en unidades de alcoxi que tengan 2 átomos de carbono, siendo de este modo un etoxilato mixto, o 2 y 3 átomos de carbono, siendo de este modo un etoxilato/propoxilado mixto, y que tienen al menos 5 restos de alcoxi, convenientemente de 5 a 25 restos de alcoxi, preferentemente de 5 a 20, en particular de 5 a 15, en la cadena de alcoxi. Los restos alifáticos de la amina o el ácido alcoxilado pueden ser de cadena lineal o ramificada de 9 a 24, preferentemente de 12 a 20, átomos de carbono. El resto de alcohol de los alcohol alcoxilados deriva por lo general de un alcohol alifático C₉- C₁₈, que puede ser ramificado o no ramificado, especialmente monorramificado. Los alcoholes preferidos son normalmente 50 % en peso de cadena lineal y 50 % en peso de alcoholes ramificados.

Como se ha indicado anteriormente, los tensioactivos antes mencionados pueden usarse solos o en combinación. Además, aunque no todos los tensioactivos mencionados anteriormente proporcionarán la sinergia deseada para las composiciones bioactivas protectoras, pueden usarse no obstante en combinación con los tensioactivos sinérgicos para su función pretendida. Por ejemplo, ciertos tensioactivos anteriormente mencionados pueden potenciar la dispersión de los activos en el disolvente o pueden potenciar la humectación del alimento o producto alimentario al que se aplican las composiciones bioactivas de la presente invención. Todos estos materiales tensioactivos se conocen bien y están disponibles en el mercado. Además, los expertos en la materia, sin experimentación indebida, apreciarán fácilmente qué tensioactivos y/o combinaciones de tensioactivos, además de los tensioactivos sinérgicos, pueden usarse para la aplicación de uso final específica. De nuevo, es importante que cuando se emplean tensioactivos adicionales para otros fines éstos no interfieran con o tengan interferencia mínima con la sinergia que resulta de los tensioactivos deseados, es decir, los que muestran sinergia al proporcionar actividad antimicrobiana, incluyendo antibacteriana y antifúngica, cuando se usan en combinación con el ácido y los iones metálicos.

Si existe cualquier interferencia y es necesario el otro tensioactivo o se desea de otro modo para la aplicación, entonces su uso debería minimizarse para producir el impacto menos adverso en la sinergia y/o los atributos de las composiciones bioactivas protectoras. Además, si hay preocupación con respecto a dicha interferencia, especialmente si se usan los tensioactivos o van a usarse en una cantidad que neutralice el ácido de las composiciones bioactivas para sacarlos del intervalo reivindicado, entonces esos tensioactivos aún pueden añadirse pero no hasta el momento de la aplicación. En esencia las composiciones bioactivas protectoras de las presentes invenciones pueden emplearse como sistemas de dos o más partes para mezclar cuando se apliquen. Más preferentemente, es mejor evitar el uso de tales tensioactivos o las cantidades de dichos tensioactivos que afectarían de forma adversa a la bioeficacia de las composiciones reivindicadas.

Las composiciones bioactivas protectoras de la presente invención pueden usarse solas o junto con o en combinación con uno o más agentes o activos convencionales para protección y/o conservación de alimentos y productos alimentarios. A la luz de su sinergia con agentes antifúngicos generales, se anticipa de forma similar que tales combinaciones manifestarán una potenciación notable y sinérgica del periodo de caducidad y reducción del deterioro. En consecuencia, se cree que los niveles previamente no eficaces de activos protectores convencionales pueden hacerse eficaces como resultado de la presencia de la solución o composición ácida bioactiva. De forma similar, se cree que estas combinaciones permitirán conseguir el mismo nivel de bioeficacia con tasas o cantidades de aplicación menores que las convencionales del activo agroquímico bioactivo convencional. Adicionalmente, y con particular importancia, se cree también que la combinación reduce la incidencia de y/o la velocidad con la que se manifiesta biorresistencia a agentes y formulaciones protectores convencionales, especialmente los agentes agroquímicos orgánicos sintéticos, en organismos diana. Por lo tanto, la expectativa de vida comercial de estos y futuros activos agroquímicos convencionales probablemente aumente y se reduzca o retarde la generación de bacterias multirresistentes o cepas resistentes de las bacterias, hongos, protistas y similares.

Las composiciones bioactivas de acuerdo con la presente invención pueden usarse solas o, preferentemente y provechosamente, se usan en combinación con (normalmente como una mezcla) uno o más componentes o aditivos compatibles adicionales típicos de composiciones y tratamientos protectores antes y después de la cosecha, incluyendo, por ejemplo, cargas o diluyentes sólidos o líquidos, adyuvantes, tensioactivos o equivalentes, que son adecuados para el uso deseado y que son aceptables para su uso, desde una perspectiva ambiental, sanitaria y de seguridad así como reguladora. En consecuencia, las formulaciones también pueden contener ingredientes de otros tipos, tales como coloides protectores, adyuvantes, aglutinantes, protectores contra la lluvia, espesantes, agentes tixotrópicos, agentes penetrantes, aceites para pulverización, estabilizadores, agentes anticongelantes, agentes desespumantes, agentes espumantes, inhibidores de corrosión, colorantes o similares, así como otros principios activos conocidos que tienen propiedades protectoras de alimentos, por ejemplo, antifúngicas, antibacterianas y antivirales, o que ralentizan de otro modo el proceso de maduración del alimento.

La naturaleza y cantidad de los aditivos para emplear en las composiciones bioactivas protectoras de la presente invención depende, en parte, de cuando deban aplicarse, cómo deban aplicarse y los productos o alimentos o productos alimentarios a los que deban aplicarse. Por ejemplo, las composiciones bioactivas protectoras pueden estar en forma de y/o fabricarse en, por ejemplo, soluciones, emulsiones de aceite en agua, polvos humectables, polvos solubles, suspensiones, polvos finos, gránulos dispersables, microcápsulas, geles, comprimidos y otros tipos de formulación por procedimientos bien establecidos. De forma similar, el procedimiento de aplicación tal como

pulverización, atomización, dispersión, espolvoreo, inmersión, revestimiento y similares puede seleccionarse basándose en la naturaleza de las composiciones para aplicar, cuando deba aplicarse, por ejemplo antes o después de la cosecha o al envasado o empaquetamiento, etc., y el alimento o producto alimentario al que deba aplicarse.

5 Aunque la definición típica de "carga" es un material añadido para el fin primario de añadir volumen, en la presente solicitud, las "cargas" normalmente tienen función y utilidad y se refieren en general a componentes orgánicos o inorgánicos, naturales o sintéticos con los que los componentes activos se combinan para facilitar su aplicación, por ejemplo, en aplicación antes de la cosecha a las plantas, árboles, vides y similares. Estas cargas son generalmente inertes y deben ser aceptables para la aplicación pretendida, especialmente para usos agrónomos, en particular para tratar plantas.

10 La carga puede ser sólida, por ejemplo arcillas, silicatos naturales o sintéticos, sílice, resinas, ceras, fertilizantes sólidos (por ejemplo sales de amonio), minerales naturales del suelo, tales como caolines, arcillas, talco, cal, carbonato cálcico, cuarzo, attapulguita, montmorillonita, bentonita o tierras diatomeas, o minerales sintéticos, tales como sílice, alúmina o silicatos, en particular silicatos de aluminio o magnesio. Las cargas sólidas que son adecuadas para gránulos son las siguientes: rocas naturales, trituradas o rotas, tales como calcitas, mármol, piedra pómez, sepiolita o dolomita; gránulos sintéticos de harinas inorgánicas u orgánicas; gránulos de material orgánico tal como serrín, cáscara de coco, mazorca o envoltura de maíz, o tallo del tabaco; diatomita, fosfato tricálcico, corcho en polvo o negro de carbón adsorbente; polímeros solubles en agua, resinas, ceras; o fertilizantes sólidos. Tales composiciones pueden, si se desea, contener uno o más agentes compatibles tales como agentes humectantes, agentes dispersantes, emulsionantes o colorantes que, cuando son sólidos, pueden actuar también como diluyentes.

15 20 Cuando los aditivos son alcalinos y probablemente aumenten el pH de las composiciones, por ejemplo, talco, cal, carbonato cálcico y mármol, la cantidad en la que se añadan no debería provocar que el pH exceda los intervalos reivindicados o debería añadirse ácido adicional para mantener el pH deseado. Preferentemente, tales materiales deberían evitarse completamente.

25 Las cargas también pueden ser líquidos, por ejemplo: agua, alcoholes, en particular butanol o glicol, así como éteres o ésteres de los mismos, en particular metil glicol acetato; cetonas, en particular acetona, ciclohexanona, metil etil cetona, metil isobutil cetona o isoforona; fracciones del petróleo tales como hidrocarburos parafínicos o aromáticos, en particular xilenos o alquilnaftalenos; aceites minerales o vegetales; clorohidrocarburos alifáticos, en particular tricloroetano o metilencloruro; clorohidrocarburos aromáticos, en particular clorobencenos; disolventes solubles en agua o altamente polares tales como dimetilformamida, dimetilsulfóxido, N,N-dimetilacetamida o N-metilpirrolidona; N-octilpirrolidona, gases licuados; o similares, tanto si se toman por separado como en una mezcla.

30

Como se ha mencionado anteriormente, dependiendo de la aplicación de uso final, las composiciones bioactivas protectoras de la invención contendrán uno o más tensioactivos adicionales (además del tensioactivo o los tensioactivos que son opcionalmente parte de la solución ácida bioactiva o composición ácida bioactiva), emulsionantes, agentes de dispersión, agentes humectantes y similares. Estos tensioactivos adicionales pueden ser

35 tensioactivos catiónicos, aniónicos, no iónicos o anfotéricos o mezclas de estos tensioactivos. Entre estos tensioactivos que se usan, por ejemplo, están sales de ácido poliacrílico, sales de ácido lignosulfónico, sales de ácido fenol sulfónico o naftaleno sulfónico, policondensados de óxido de etileno con alcoholes grasos, ácidos grasos, ésteres grasos o aminas grasas, fenoles sustituidos (en particular alquilfenoles o arilfenoles), sales de ésteres de ácido sulfosuccínico, derivados de taurina (en particular alquiltauratos), ésteres fosfóricos de alcoholes o de policondensados de óxido de etileno con fenoles, ésteres de ácidos grasos con polioles, o derivados funcionales de sulfato, sulfonato o fosfato de los compuestos anteriores así como los tensioactivos descritos anteriormente en relación con el tensioactivo sinérgico para la solución o composición ácida bioactiva. Aquí, sin embargo, los tensioactivos se presentan generalmente a concentraciones mucho mayores frente a la necesaria para mostrar sinergia con respecto a la combinación de ácido/metal. La presencia de al menos un tensioactivo adicional es

40 generalmente esencial cuando los materiales activos y/o la carga inerte son insolubles o solamente poco solubles en agua y cuando la carga para dicha composición para aplicar es agua. Para aplicaciones foliares, la selección de tensioactivos es con frecuencia fundamental para obtener buena humectación de la superficie del alimento o producto alimentario y, por lo tanto, la biodisponibilidad del material o los materiales activos; por lo tanto, se usará preferentemente una combinación de un tensioactivo de naturaleza hidrófila (HLB>10) y un tensioactivo de

45 50 naturaleza lipófila (HLB<5).

Generalmente, cuando la composición bioactiva protectora debe aplicarse directamente al alimento o producto alimentario, la composición incluirá un aglutinante, protector contra la lluvia, u otros componentes de tipo adhesivo para asegurar la adherencia a largo plazo de los materiales bioactivos a la superficie de alimento o producto alimentario. Los aglutinantes adecuados que se conocen bien incluyen, por ejemplo, polímeros formadores de

55 películas solubles en agua y dispersables en agua. Los polímeros adecuados tienen un peso molecular medio de al menos aproximadamente 1.000 hasta aproximadamente 100.000; más específicamente al menos aproximadamente 5.000 hasta aproximadamente 100.000. Las composiciones bioactivas protectoras basadas en una solución ácida bioactiva generalmente contienen de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 10 %, preferentemente de aproximadamente el 1,0 % a aproximadamente el 5 %, en peso de la composición del aglutinante, polímero formador de película y similares. Los polímeros formadores de películas adecuados incluyen, pero sin limitación a)

60 copolímeros en bloque y aleatorios de alquilen óxido tales como copolímeros en bloque de óxido de etileno-óxido de propileno (copolímeros en bloque EO/PO) incluyendo copolímeros en bloque tanto EO-PO-EO como PO-EO-PO;

copolímeros en bloque y aleatorios de óxido de etileno-óxido de butileno, aductos de alquilo C₂-C₆ de copolímeros en bloque y aleatorios de óxido de etileno-óxido de propileno, aductos de alquilo C₂-C₆ de copolímeros en bloque y aleatorios de óxido de etileno-óxido de butileno; b) polioxi-etilen-polioxi-propileno monoalquiléteres tales como metil éter, etil éter, propil éter, butil éter o mezclas de los mismos; c) copolímeros de vinilacetato/vinilpirrolidona, d) copolímeros alquilados de vinilpirrolidona, e) polivinilpirrolidona y f) polialquilenglicol incluyendo los propilenglicoles y polietilenglicoles. Los ejemplos específicos de polímeros adecuados incluyen Pluronic P103 (BASF) (copolímero en bloque EO-PO-EO), Pluronic P65 (BASF) (copolímero en bloque EO-PO-EO), Pluronic P108 (BASF) (copolímero en bloque EO-PO-EO), Vinamul 18160 (National Starch) (polivinilacetato), Agrimer 30 (ISP) (polivinilpirrolidona), Agrimer VA7w (ISP) (copolímero de vinil acetato/vinilpirrolidona), Agrimer AL 10 (ISP) (copolímero de vinilpirrolidona alquilada), PEG 400 (Uniqema) (polietilenglicol), Pluronic R 25R2 (BASF) (copolímero en bloque PO-EO-PO), Pluronic R 31R1 (BASF) (copolímero en bloque PO-EO-PO) y Witconol NS 500LQ (Witco) (copolímero de butanol PO-EO).

Los materiales adhesivos y de tipo adhesivo adicionales que pueden usarse incluyen carboximetilcelulosa o polímeros naturales o sintéticos en forma de polvos, gránulos o matrices, tales como goma arábiga, látex, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico o polivinil acetato, fosfolípidos naturales, tales como cefalinas o lecitinas, o pueden usarse fosfolípidos sintéticos en las formulaciones.

También pueden ser deseable espesar las composiciones bioactivas protectoras, especialmente cuando preocupa que la composición se desprenda o se caiga rápidamente del alimento o producto alimentario al que se aplica y/o cuando sea deseable un revestimiento "más espeso" de la composición en la superficie del alimento o producto alimentario. Los espesantes adecuados incluyen polímeros solubles en agua que muestran propiedades pseudoplásticas y/o tixotrópicas en un medio acuoso tal como goma arábiga, goma karaya, goma de tragacanto, goma guar, goma de algarrobo, goma de xantano, carragenina, sal de alginato, caseína, dextrano, pectina, agar, 2-hidroxi-etil almidón, 2-amino-etil almidón, 2-hidroxi-etil celulosa, metilcelulosa, sal de carboximetilcelulosa, sal de sulfato de celulosa, poli(acrilamida), sales de metales alcalinos de los copolímeros de anhídrido maleico, sales de metales alcalinos de poli(met)acrilato y similares. Como espesantes adecuados, incluyendo agentes tixotropos, también pueden mencionarse arcilla de tipo attapulguita, sílice, sílice pirógena, carragenina, croscarmelosa sódica, furcerelano, glicerol, hidroxipropil celulosa, poliestireno, copolímero en bloque de vinilpirrolidona/estireno, hidroxipropil celulosa, hidroxilpropil goma guar y carboximetilcelulosa sódica. Se prefiere goma de xantano.

En el caso de composiciones agroquímicas bioactivas que se someten o pueden someterse a congelación durante el almacenamiento o uso, especialmente concentrados y soluciones acuosas y basados en agua, es deseable añadir aditivos anticongelantes. Ejemplos específicos de anticongelantes adecuados incluyen etanol, 1,2-propileno glicol, 1,3-propileno glicol, 1,2-butanodiol, 1,3-butanodiol, 1,4-butanodiol, 1,4-pentanodiol, 3-metil-1,5-pentanodiol, 2,3-dimetil-2,3-butanodiol, trimetilol propano, manitol, sorbitol, glicerol, pentaeritritol, 1,4-ciclohexanedimetanol, xilenol, bisfenoles tales como bisfenol A o similares. Además, éter alcoholes tales como dietileno glicol, trietileno glicol, tetraetileno glicol, polioxi-etileno o polioxi-propileno glicoles de peso molecular de hasta aproximadamente 4.000, dietileno glicol monometiléter, dietileno glicol monoetiléter, trietileno glicol monometiléter, butoxietanol, butileno glicol monobutyléter, dipentaeritritol, tripentaeritritol, tetrapentaeritritol, diglicerol, triglicerol, tetraglicerol, pentaglicerol, hexaglicerol, heptaglicerol, octaglicerol y similares. Como un subconjunto particular de materiales anticongelantes adecuados pueden mencionarse etanol, propilenglicol y glicerina.

Es posible usar colorantes tales como pigmentos inorgánicos, tales como, por ejemplo: óxidos de hierro, óxidos de titanio, azul de Prusia; materias colorantes orgánicas, tales como las del tipo alizarina, azo o metal ftalocianina; o de oligoelementos tales como sales de hierro, manganeso, boro, cobre, cobalto, molibdeno o zinc. El uso de tales colorantes permite determinar qué áreas y sustratos, incluyendo plantas, se han tratado con la composición bioactiva. Dicho marcaje es especialmente importante para una aplicación antes de la cosecha, especialmente aplicación aérea, de goteo o a voleo ya que permite que el piloto o conductor del vehículo de distribución vea qué áreas ya se han tratado.

Aunque no se han descrito anteriormente todos los aditivos y adyuvantes, los expertos en la materia, particularmente en la materia pertinente a la aplicación de uso final específica anticipada, apreciarán sin duda que otros ingredientes, aditivos y similares podrían o deberían usarse para su aplicación. Por el mismo motivo, los expertos en la materia apreciarán fácilmente que muchos de los ácidos anteriormente mencionados, metales antimicrobianos, tensioactivos y otros aditivos mencionados, por ejemplo, aditivos anticongelantes de etilenglicol, son inapropiados para consumo humano, si no para consumo animal. Por lo tanto, debe apreciarse que el alcance de la presente invención concierne a las composiciones que pueden aplicarse de forma segura y son aceptables para el consumo humano y/o animal. A este respecto, también debe apreciarse que ciertos componentes pueden ser adecuados para consumo humano y/o animal a ciertas concentraciones o después de un periodo de tiempo específico y, por lo tanto, esos materiales y el agente bioactivo protector de la invención que los contiene están dentro del alcance pretendido de la presente invención.

La cantidad en la que cada aditivo debe incorporarse a las composiciones bioactivas protectoras dependerá, de nuevo, de la aplicación de uso final y del procedimiento de aplicación y el ambiente en el que deba emplearse. Generalmente, sin embargo, la selección y cantidad es la convencional para tales aditivos en tales aplicaciones. Sin embargo, con la selección de cualquier aditivo, es importante asegurar que no interferirán en la bioactividad de las

composiciones de la presente invención o que cualquier interferencia tal se minimizará para permitir aprovechar al máximo las composiciones bioactivas protectoras de la presente invención. Los expertos en la materia, basándose en las enseñanzas expuestas en el presente documento y en los siguientes ejemplos, apreciarán dónde debe prestarse atención y, en cualquier caso, esta puede abordarse por aplicaciones de exploración simples.

- 5 Como se ha indicado anteriormente, es importante evitar el uso de activos agroquímicos bioactivos convencionales así como cualquier otro aditivo y componente, incluyendo los de los tipos mencionados anteriormente, que interfieran con o afecten de forma adversa a la bioeficacia de las composiciones de acuerdo con la presente invención. Más especialmente, es importante evitar el uso de los activos agroquímicos y otros aditivos o compuestos que se sabe que o probablemente se secuestrarán, se unirán o formarán complejo de forma irreversible o fuertemente con los iones metálicos antimicrobianos en solución. Por lo tanto, sin pretender quedar ligado por la teoría, se cree que la retención de la carga iónica metálica antimicrobiana es importante para mantener la bioeficacia. Por ejemplo, es mejor evitar el uso de sales de amonio tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, citrato de amonio, fosfato de amonio. En la medida en que tales materiales están presentes o van a usarse, su uso o, de forma más precisa, la cantidad de los mismos, debería minimizarse y/o la concentración de iones metálicos aumentarse para compensar la pérdida de iones libres en compuestos en solución.

Las composiciones bioactivas protectoras de la presente invención pueden realizarse por cualquier procedimiento conocido para formular composiciones agroquímicas, especialmente composiciones de tipo antimicrobiano y antifúngico. En general, si se realiza un sistema líquido o un sistema sólido, la solución ácida bioactiva o, si es aplicable, la composición ácida bioactiva sólida se prepara antes de la adición de un activo o formulación bioactivo convencional y/u otros aditivos y agentes agroquímicos convencionales, todos como se han analizado anteriormente.

La solución ácida bioactiva puede prepararse de varias maneras convencionales. Por ejemplo, cada componente puede disolverse en el disolvente apropiado, más en particular agua o disolvente a base de agua, y las soluciones combinarse en las proporciones adecuadas. En cierto grado, la secuencia de la adición y si se forma un preconcentrado del ácido en el disolvente dependen de la solubilidad de los sólidos en sí mismos. Preferentemente, el ácido se disuelve inicialmente en el disolvente apropiado a la concentración deseada. Cuando se pretende formar en primer lugar un concentrado para reducir para la aplicación, la cantidad de ácido para disolver en el disolvente debería ser tal que la concentración de ácido sea al menos del 40 por ciento y preferentemente del 40 al 80 por ciento. La fuente o las fuentes de iones metálicos antimicrobianos se disuelven después en la solución ácida concentrada. El uso de una solución ácida concentrada también es beneficioso cuando la fuente de metales antimicrobianos se disuelve más fácilmente o es soluble en la solución ácida concentrada a diferencia de solución ácida completamente diluida o agua. Por ejemplo, como se ha mencionado anteriormente, cuando la fuente de iones metálicos es un agente de tipo intercambio iónico que contiene un ión metálico antimicrobiano, especialmente cuyo núcleo es una zeolita, se ha descubierto que el uso de ácidos concentrados disuelve fácilmente la zeolita. A continuación, la solución concentrada se diluye simplemente con el diluyente líquido apropiado, normalmente agua o un diluyente a base de agua, más normalmente agua, a la concentración deseada después de que se disuelvan los sólidos.

Cuando hay dificultad en la disolución de la fuente o las fuentes metálicas antimicrobianas en la solución ácida concentrada o diluida, o la velocidad es menor de lo deseado, la fuente o las fuentes de iones metálicos antimicrobianos puede disolverse en primer lugar en agua u otro disolvente a base de agua adecuado y después combinarse con la solución de ácido formada. Aquí, la solución de ácido es preferentemente de una concentración mayor que la pretendida en la composición bioactiva protectora para compensar la dilución tras añadir la fuente o las fuentes de iones metálicos antimicrobianos disueltas.

De forma similar, puede ser deseable realizar soluciones madre individuales de cada uno de los componentes de la solución ácida bioactiva combinándose después dichas soluciones madre en las proporciones apropiadas. De nuevo, la concentración de cada solución madre se adaptaría para compensar la dilución tras su combinación.

En cada uno de los casos anteriores, el disolvente/las soluciones pueden calentarse y preferentemente se agitan para potenciar la solubilidad/facilitar la disolución de los sólidos en el sistema líquido. Además, aunque la disolución de la fuente o las fuentes de iones metálicos antimicrobianos es quizás el procedimiento más simple y más económico de la preparación de las soluciones ácidas bioactivas, estas soluciones ácidas bioactivas también pueden prepararse, por ejemplo, generando de forma electrolítica el ión metálico en soluciones ácidas como se ha visto en Arata y col. (documentos US 6.197.814; US 2003/0198689A1; US 2003/0178374A1; US2005/0245605A1 y US2006/0115440A1) o por alta temperatura y presión como se ha visto en Cummins y col. (documento US 7.192.618).

Los tensioactivos pueden añadirse a la solución ácida bioactiva o el concentrado o pueden añadirse simultáneamente con o posteriormente a la combinación de la solución ácida bioactiva con la composición agroquímica bioactiva convencional.

También pueden realizarse composiciones bioactivas protectoras sólidas en suspensión de varias maneras. Por ejemplo, pueden mezclarse en seco el ácido, la fuente o las fuentes de iones metálicos antimicrobianos, una carga o

diluyente sólido, y, si está presente, el tensioactivo. La mezcla en seco aún es posible incluso si el tensioactivo o uno de los tensioactivos es un líquido puesto que la cantidad empleada es muy baja y se adsorberá o absorberá por los materiales secos. Como alternativa, si se desea realizar un concentrado que posteriormente se reduzca para aplicación, puede simplemente omitirse o reducirse la cantidad de la carga sólida o diluyente cuando se prepara la mezcla seca. En el momento de uso, esta mezcla seca concentrada se reduce después con la carga sólida o diluyente a la concentración de uso final deseada.

Aunque la mezcla en seco es la manera más fácil de formar el concentrado de composición ácida bioactiva sólido mencionado anteriormente, este también puede prepararse formando una solución ácida bioactiva altamente concentrada usando un disolvente volátil, por ejemplo, agua o un disolvente a base de agua, y permitiendo después que el disolvente se evapore para dejar el material sólido. Según sea necesario, después se tritura o muele el material sólido para formar partículas pequeñas, polvo o gránulos, de la composición ácida bioactiva sólida.

Las composiciones bioactivas protectoras sólidas también pueden prepararse tratando una carga sólida o material diluyente con una solución ácida bioactiva concentrada o algo concentrada. Aquí la solución ácida bioactiva líquida se aplica a o se combina con el material de carga, que está preferentemente en forma de partículas, y la adsorben y/o absorben las partículas de la carga. Por ejemplo, puede pulverizarse una bruma de la solución ácida bioactiva o puede verse un chorro continuo o intermitente de la solución ácida bioactiva sobre las partículas a medida que se remueven, agitan, etc. Cuando está presente también un activo convencional de activo formulado en forma de partícula en la composición bioactiva protectora, también se contempla que esas partículas o una parte de las mismas pueden tratarse de forma similar con la solución bioactiva y emplearse en lugar de o además de la carga sólida o diluyente anteriormente mencionado.

Dados los altos costes de transporte y la facilidad de dilución, es más preferible y económico preparar concentrados, especialmente concentrados líquidos, de las composiciones bioactivas protectoras de la invención diluyéndose o reduciéndose después tales concentrados en el momento de la aplicación. Otros concentrados líquidos se diluyen después o se reducen con un disolvente apropiado, especialmente agua o un disolvente a base de agua, a la concentración deseada para la aplicación.

Sorprendentemente, las composiciones bioactivas protectoras muestran una bioeficacia notable incluso a tales niveles bajos de ión metálico antimicrobiano. Esto es especialmente deseable porque evita o ciertamente reduce las preocupaciones con respecto a fitotoxicidad, una consecuencia que puede matar a la planta y/o alterar la impresión visual del alimento o cultivo que se trate. Adicionalmente, produce en gran medida la cantidad de metales liberados al ambiente, particularmente en el caso de aplicaciones antes de la cosecha, así como de la limpieza de cualquier aparato de aplicación y tanques así como liberaciones que se producen cuando el alimento o el producto alimentario tratado se lava antes de su consumo. A este respecto, recientes investigaciones sobre la pureza del agua han mostrado niveles detectables de diversos agentes farmacéuticos en los suministros de agua para beber que se cree que se deben al vertido de prescripciones caducadas por los consumidores a través de sus desagües. Aunque se han detectado agentes agroquímicos, metales pesados y similares desde hace largo tiempo en el agua para beber, normalmente se han atribuido a aplicación en el campo y desechos industriales; sin embargo, a la luz de lo anterior con respecto a agentes farmacéuticos, parece razonable que una vía de contaminación adicional es el lavado de alimentos y compuestos alimentarios tratados con esos agentes. Además, las composiciones bioactivas protectoras de la presente invención no inducen ni conducen, o es mucho menos probable que lo hagan, a la manifestación de biorresistencia en los organismos diana: un accidente creciente con agentes orgánicos que, aunque es molesto en la actualidad, podría conducir a resultados catastróficos si no se controla.

Normalmente, la tasa de aplicación de las composiciones agroquímicas bioactivas de la presente invención para aplicaciones antes de la cosecha es tal que la cantidad total de iones metálicos antimicrobianos (como metales) originados a partir de la fuente o las fuentes de iones antimicrobianos disueltas aplicadas por cada 0,4 hectáreas (por acre) será de aproximadamente 200 gramos o menos, preferentemente 100 gramos o menos, más preferentemente 50 gramos o menos, más preferentemente 20 gramos o menos. Por su puesto la tasa de aplicación específica y, por lo tanto, la cantidad total aplicada por cada 0,4 hectáreas (por acre), variará entre organismos diana, entre formas y entre procedimientos de aplicación. De hecho, las tasas adecuadas pueden ser tales que el ión metálico total (como metal) pueda estar en el orden de 5 gramos por cada 0,4 hectáreas (por acre), incluso en el orden de fracciones de 1 gramo por cada 0,4 hectáreas (por acre), quizás tan bajas como 0,5 gramos por cada 0,4 hectáreas (por acre) o incluso 0,05 gramos por cada 0,4 hectáreas (por acre). Aunque cargas mayores, mayores de 200 gramos por cada 0,4 hectáreas (por acre), pueden proporcionar bioeficacia aún mayor o más rápida, la contrapartida del aumento de las preocupaciones ambientales, sobre la salud y de seguridad no garantiza generalmente o no está normalmente justificada por el aumento, con frecuencia aumento nominal, de la bioeficacia. De otro modo, para aplicación directa al alimento o producto alimentario o al envasado o empaquetamiento, la composición bioactiva protectora de las concentraciones y constituyentes reivindicados se aplica para revestir completamente o humectar el sustrato para tratar o el mismo se sumerge en la solución.

Las composiciones bioactivas protectoras pueden aplicarse a cualquier alimento, producto alimentario, pienso o producto de pienso. Pueden realizarse aplicaciones en el campo antes de la cosecha a árboles frutales, cultivos vegetales, cultivos de pienso y similares. De forma similar, pueden aplicarse como una aplicación después de la cosecha a los cultivos cosechados incluyendo soja, tomates, patatas, manzanas, peras, melocotones, uvas,

remolachas, zanahorias, lechuga, espinaca, berza, remolachas azucareras, calabazas, melones, pimientos, cítricos y similares. También pueden aplicarse a alimentos y productos alimentarios proteicos y de otros tipos incluyendo huevos, aves de corral, carnes, pescado y similares.

5 Como alternativa, las composiciones bioactivas protectoras pueden aplicarse al envasado o al empaquetamiento en el que tales productos y cultivos se almacenan, transportan o venden. Aquí el material de envasado o de empaquetamiento se trata, por ejemplo, se pulveriza, reviste o satura, con la solución ácida bioactiva y se permite que se seque. Adicionalmente, las composiciones bioactivas sólidas pueden incorporarse en el material de envasado o de empaquetamiento durante su fabricación. Finalmente, también se contempla que la composición bioactiva protectora puede incorporarse en hielo en el que va a envasarse el alimento o producto alimentario.

10 La bioeficacia de las composiciones bioactivas protectoras y procedimientos de la presente invención se demuestra por un aumento de la vida de almacenamiento o el periodo de caducidad del alimento tratado con o expuesto a las composiciones. Cualquier retardo del deterioro y envejecimiento, especialmente un retardo de incluso un día o dos, especialmente cinco o más días, particularmente en el caso de frutas y hortalizas, es significativo, particularmente desde un punto de vista económico. Esto es cierto incluso si el resultado no es completo para todo el cultivo tratado.

15 En esencia, incluso una mejora del 10 % en el producto que se puede vender puede tener un impacto económico significativo en los productores, vendedores al por mayor, proveedores de servicios alimentarios y vendedores. Las composiciones y procedimientos de la presente invención proporcionan y se anticipa que proporcionan mejoras aún mayores en productos que se pueden vender, de hasta el 25 % o más, preferentemente del 50 % o más. Cuando hay una preocupación particular por patógenos humanos portados por el alimento, entonces es más deseable que

20 las composiciones bioactivas protectoras proporcionen un rendimiento logarítmico de muerte, especialmente al menos una muerte de dos log (99 %), si no mayor.

Los siguientes ejemplos se presentan como demostraciones de la bioeficacia de las composiciones agroquímicas bioactivas de acuerdo con la presente invención así como la sinergia inesperada resultante del uso de ciertos tensioactivos y/u otros activos agroquímicos activos convencionales y activos formulados. Estos ejemplos son

25 meramente ilustrativos de la invención y no deben considerarse limitantes de la misma. Los expertos en la materia reconocerán muchas variaciones que están dentro del alcance de las reivindicaciones.

Estudios de *Saccharomyces cerevisiae*

Se realiza una serie de experimentos (Ejemplos 1 - 269 posteriores) para evaluar el rendimiento de los componentes individuales de las composiciones bioactivas reivindicadas así como diversas combinaciones de las mismas,

30 incluyendo las composiciones reivindicadas en sí mismas, en la supresión del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panadero de Fleishmann). Se seleccionó *Saccharomyces cerevisiae* como un organismo de ensayo como se acepta generalmente en la industria como un organismo indicador o sustituto para una diversidad amplia de hongos y mohos. En cada uno de estos experimentos, se siguió el mismo procedimiento general a no ser que se indique de otro modo.

35 Detalle Experimental: Se preparó un medio de cultivo añadiendo 10 gramos de medio nutriente (caldo de dextrosa Difco Sabouraud de BD de Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos) a 300 ml de agua destilada. Se añadió después levadura de panadero de Fleishmann al medio de cultivo mezclando a la vez usando un agitador magnético hasta que se obtuvo una dispersión uniforme que tenía una turbidez inicial de entre aproximadamente 50 y 100 UNT como se mide usando un Turbidímetro DRT 100B de HF Instruments. Una vez que se obtuvo la dispersión apropiada, se

40 distribuyeron después alícuotas de 20 ml, con mezcla continuada, en frascos de vidrio de borosilicato de 40 ml con tapones revestidos con Teflón (VWR International Cat. N° 15900-004). El sistema/componente para evaluar se añadió después al frasco y se agitó de forma íntima para asegurar una buena mezcla sustancialmente homogénea. Después se determinó la turbidez de cada mezcla y el frasco se transfirió a una incubadora a 30 °C. Cada frasco se retiró periódicamente del incubador y la mezcla en los frascos se evaluó con respecto a turbidez: el momento

45 específico para dicha evaluación fue como se expone en el análisis de los experimentos y las tablas adjuntas.

En cada experimento, a no ser que se especifique de otro modo, se añadieron 2 ml de solución acuosa que contenía el sistema bioactivo específico o componente del mismo a la suspensión de levadura de 20 ml y se mezcló de forma exhaustiva. Normalmente los tensioactivos se añadieron por separado en una solución concentrada en agua; sin embargo el volumen añadido fue insignificante: una fracción de 1 ml. Por conveniencia en el entendimiento de los

50 niveles de eficacia, las cantidades o concentraciones de los diversos componentes presentados en cada una de las diversas tablas y experimentos son del material diluido en el frasco de ensayo; no del concentrado añadido al frasco de ensayo. Además, las concentraciones presentadas están basadas en un volumen total de 20 ml, no el volumen real de más de 22 ml. La multiplicación de cada una de las concentraciones enumeradas por 0,9 (o 0,95 con las composiciones que usan soluciones acuosas de 1 ml) proporcionará una evaluación más precisa de las

55 concentraciones de los diversos componentes evaluados, es decir, una concentración de plata de 5 ppm está de hecho más cerca de 4,5 ppm. Finalmente, para los frascos a los que no se añadió sistema bioactivo o componente del mismo (los controles) o que solamente contenía los tensioactivos, se añadieron 2 ml de medio de cultivo adicional para asegurar las diluciones equivalentes relativas de la levadura.

En las tablas más adelante, se presentan los resultados como las lecturas de turbidez reales (UNT) con una subtabla que presenta el cambio o delta en valores de UNT. Dada la naturaleza del sistema, los cambios de la turbidez reflejan el rendimiento/bioeficacia relativos de los sistemas bioactivos y sus componentes. En ciertos casos, un alto nivel de material bioactivo, especialmente el componente metálico, provocó un aumento inmediato y relativamente brusco de la densidad óptica o de la turbidez. Se cree que esto fue el resultado de lisar al menos una parte de las células de levadura en sí mismas. En consecuencia, especialmente en los ejemplos que tienen un alto nivel de bioactivo, es igualmente, si no más, importante mirar el cambio de turbidez de los resultados de turbidez de media hora o una hora, si se presenta, hacia delante, no desde el momento cero.

Ejemplos 1-21 - Concentración de ácidos

Se realizó una primera serie de experimentos para evaluar el rendimiento de diversos metales antimicrobianos y combinaciones de tales metales, con y sin ácido cítrico y con y sin tensioactivo aniónico lauroil sarcosinato sódico. Cada uno de los metales se añadió en forma de una solución acuosa de sus sales de citrato, concretamente, citrato de plata, citrato de cobre y citrato de cinc o, en el caso en el caso de los Ejemplos 16-19, como una mezcla de las tres sales de citrato (MI1). Las formulaciones específicas evaluadas y los resultados del estudio de crecimiento de levadura resultante se muestran en las Tablas 1 y 1A.

Como se ve en las Tablas 1 y 1A, las formulaciones que tienen el tensioactivo tanto ácido como aniónico proporcionaron una notable inhibición del crecimiento de la levadura hasta al menos el primer periodo de 24 horas, incluso con el nivel más bajo de tensioactivo aniónico. Las muestras que solamente tenían el ión metálico o el ión metálico en combinación con el ácido no tuvieron ningún efecto apreciable en el crecimiento de levadura. Aunque también se observó alguna inhibición en las muestras en las que solamente estaban presentes el metal o los metales y tensioactivo, la inhibición no fue apreciable. En su lugar, como se ha indicado, la presencia adicional de ácido en exceso proporcionó un nivel de mejora notable e inesperado. Finalmente, la formulación que tenía los tres iones metálicos antimicrobianos, más el ácido y el tensioactivo proporcionados continuaron mostrando excelente inhibición del crecimiento de levadura incluso en el límite de ensayo de 96 horas.

Ejemplos 22 - 42 - Evaluación de tensioactivos

Se realizó de nuevo una serie similar de experimentos para evaluar el rendimiento de diversas combinaciones de los componentes de las composiciones bioactivas

Tabla 1

Ejemplo	Ión Metálico y Cantidad (ppm)	Ácido cítrico (% en peso)	Lauroil Sarcosinato Sódico (% en peso)	Turbidez (UNT) Tiempo cero	Turbidez (UNT)			
					Tiempo 1 hora	T 18 horas	T 24 horas	T 96 horas
1	Ag 5 ppm	0		44,5	59,6	890	932	995
2	Ag 5 ppm	1		47,5	64	882	902	1044
3	Ag 5 ppm	2		50,9	68,4	881	950	1025
4	Ag 5 ppm	0	0,005	46,8	51,5	596	677	673
5	Ag 5 ppm	1	0,005	59,4	68,4	85	130	854
6	Ag 5 ppm	2	0,005	70,9	75	85	120	880
7	Zn 5 ppm	0		43,8	64,5	992	993	1051
8	Zn 5 ppm	1		46,6	66,5	934	962	1027
9	Zn 5 ppm	2		49,5	71	936	1038	1063
10	Zn 5 ppm	0	0,005	45,9	63	656	747	712
11	Zn 5 ppm	1	0,005	57	71	160	223	744
12	Zn 5 ppm	2	0,005	73	76,5	105	119	466
13	Cu 5 ppm	0		45,6	68	940	1021	1100
14	Cu 5 ppm	1		49	72	940	1018	1102
15	Cu 5 ppm	2		49	74	900	973	1100
16	MI1	0	0,005	39	44,5	449	575	658
17	*MI1	1	0,005	73,9	87	100	105	732
18	MI1	2	0,005	132	137	137	137	690
19	MI1 Control	1	0,01	74,5	74,8	87	89	116
20	Control (Sin Biocida)			53,2	69,4	1031	1085	1122
21	Control (Sin Biocida)			53,2	78	1101	1093	1128

*MI1 una solución de ácido cítrico al 4 % que contiene 50 ppm de cada uno de Ag, Cu y Zn por ml que proporcionan ~ 5 ppm de cada uno en el frasco de ensayo

Tabla 1A

Ejemplo	Ión Metálico y Cantidad (ppm)	Ácido cítrico (% en peso)	Lauroil Sódico (% en peso)	Sarcosinato (% en peso)	Cambio de Turbidez de T ₀ (delta UNT)			
					Tiempo 1 hora	T 18 horas	T 24 horas	T 96 horas
1	Ag 5 ppm	0			15,1	845,5	887,5	950,5
2	Ag 5 ppm	1			16,5	834,5	854,5	996,5
3	Ag 5 ppm	2			17,5	830,1	899,1	974,1
4	Ag 5 ppm	0		0,005	4,7	549,2	630,2	626,2
5	Ag 5 ppm	1		0,005	9	25,6	70,6	794,6
6	Ag 5 ppm	2		0,005	4,1	14,1	49,1	809,1
7	Zn 5 ppm	0			20,7	948,2	949,2	1007,2
8	Zn 5 ppm	1			19,9	887,4	915,4	980,4
9	Zn 5 ppm	2			21,5	886,5	988,5	1013,5
10	Zn 5 ppm	0		0,005	17,1	610,1	701,1	666,1
11	Zn 5 ppm	1		0,005	14	103	166	687
12	Zn 5 ppm	2		0,005	3,5	32	46	393
13	Cu 5 ppm	0			22,4	894,4	975,4	1054,4
14	Cu 5 ppm	1			23	891	969	1053
15	Cu 5 ppm	2			25	851	924	1051
16	MI1	0		0,005	5,5	410	536	619
17	*MI1	1		0,005	13,1	26,1	31,1	658,1
18	MI1	2		0,005	5	5	5	558
19	MI1 Control	1		0,01	0,3	12,5	14,5	41,5
20	Control (Sin Biocida)				16,2	977,8	1031,8	1068,8
21	Control (Sin Biocida)				24,8	1047,8	1039,8	1074,8

*MI1 una solución de ácido cítrico al 4 % que contiene 50 ppm de cada uno de Ag, Cu y Zn por ml que proporcionan ~ 5 ppm de cada uno en el frasco de ensayo

de la presente invención así como para demostrar otros tensioactivos aniónicos y combinaciones de tensioactivos. Las formulaciones específicas evaluadas y los resultados de crecimiento de levadura se presentan en las Tablas 2 y 2A.

- 5 De nuevo, la importancia de los tres constituyentes fue evidente a partir de los resultados mostrados en las Tablas 2 y 2A. Estos resultados confirman adicionalmente que incluso un exceso bajo del contenido de ácido, aquí 0,4 %, proporciona excelente inhibición del crecimiento de levadura hasta 96 horas. Los resultados algo insatisfactorios mostrados en los Ejemplos 26 y 29 sugieren cierta variación entre tensioactivos aniónicos, al menos con lauril sulfato sódico (SLS), con iones de cinc y cobre. Sin embargo, los resultados son significativamente mejores que sin ningún
- 10 tensioactivo en absoluto y sugieren una posible sinergia con dos. Además, debido a la solubilidad más fácil del SLS,

Tabla 2

Ejemplo	Citratos Metálicos (ppm) en ácido cítrico 4 %	Tensioactivo (% en peso)	Tiempo cero	Turbidez (UNT)			
				T 1 hora	T 18 horas	T 24 horas	T 96 horas
22	Cobre 5 ppm		103	114	410	463	588
23	Cinc 5 ppm		103	118	475	488	589
24	Plata 5 ppm		155	168	181	190	670
25	Cobre 5 ppm	0,005 NaLS	145	146	157	160	149
26	Cobre 5 ppm	0,005 SLS	119	128	252	326	502
27	Cobre 5 ppm	0,005 NaLS: 0,005 SLS	145	144	156	154	157

ES 2 394 476 T3

(continuación)

Ejemplo	Citratos Metálicos (ppm) en ácido cítrico 4 %	Tensioactivo (% en peso)	Tiempo cero	Turbidez (UNT)			
				T 1 hora	T 18 horas	T 24 horas	T 96 horas
28	Cinc 5 ppm	0,005 NaLS	148	156	157	157	157
29	Cinc 5 ppm	0,005 SLS	125	134	217	234	539
30	Cinc 5 ppm	0,005 NaLS: 0,005 SLS	155	155	157	157	158
31	Plata 5 ppm	0,005 NaLS	170	170	184	184	180
32	Plata 5 ppm	0,005 SLS	177	177	193	196	196
33	Plata 5 ppm	0,005 NaLS: 0,005 SLS	193	190	198	199	199
34	Cobre 2,5 ppm: Cinc 2,5 ppm		99	109	498	510	614
35	Cobre 2,5 ppm: Plata 2,5 ppm		128	152	424	530	727
36	Cinc 2,5 ppm: Plata 2,5 ppm		128	151	541	621	720
37	Control 1 (sin biocida)		91	114	560	580	754
38	Control 2 (sin biocida)		91	114	563	584	726
39	Cobre 2,5 ppm: Cinc 2,5 ppm	0,005 NaLS: 0,005 SLS	192	180	193	193	193
40	Cobre 2,5 ppm: Plata 2,5 ppm	0,005 NaLS: 0,005 SLS	181	204	205	206	206
41	Cinc 2,5 ppm: Plata 2,5 ppm	0,005 NaLS: 0,005 SLS	194	193	212	212	212
42	Cobre 2,5ppm: Plata 2,5 ppm: Cinc 2,5 ppm	0,005 NaLS: 0,005 SLS	193	193	199	200	205

* NaLS - lauroil sarcosinato sódico, SLS - lauril sulfato sódico

Tabla 2A

Ejemplo	Citratos metálicos (ppm) en ácido cítrico 4 %	Tensioactivo* (% en peso)	Cambio de Turbidez de T0 (delta UNT)			
			T 1 hora	T 18 hora	T 24 hora	T 96 hora
22	Cobre 5 ppm		11	307	360	485
23	Cinc 5 ppm		15	372	385	486
24	Plata 5 ppm		13	26	35	515
25	Cobre 5 ppm	0,005 NaLS	1	12	15	4
26	Cobre 5 ppm	0,005 SLS	9	133	207	383
27	Cobre 5 ppm	0,005 NaLS: 0,005 SLS	-1	11	9	12
28	Cinc 5 ppm	0,005 NaLS	8	9	9	9
29	Cinc 5 ppm	0,005 SLS	8	91	108	413
30	Cinc 5 ppm	0,005 NaLS: 0,005 SLS	0	2	2	3
31	Plata 5 ppm	0,005 NaLS	0	14	14	10
32	Plata 5 ppm	0,005 SLS	0	16	19	19
33	Plata 5 ppm	0,005 NaLS: 0,005 SLS	-3	5	6	6
34	Cobre 2,5 ppm: Cinc 2,5 ppm		10	399	411	515
35	Cobre 2,5 ppm: Plata 2,5 ppm		24	296	402	599
36	Cinc 2,5 ppm: Plata 2,5 ppm		23	413	493	592
37	Control 1 (sin biocida)		23	469	489	663
38	Control 2 (sin biocida)		23	472	493	635
39	Cobre 2,5 ppm: Cinc 2,5 ppm	0,005 NaLS: 0,005 SLS	-12	1	1	1

(continuación)

Ejemplo	Citratos metálicos (ppm) en ácido cítrico 4 %	Tensioactivo* (% en peso)	Cambio de Turbidez de T0 (delta UNT)			
			T 1 hora	T 18 hora	T 24 hora	T 96 hora
40	Cobre 2,5 ppm: Plata 2,5 ppm	0,005 NaLS: 0,005 SLS	23	24	25	25
41	Cinc 2,5 ppm: Plata 2,5 ppm	0,005 NaLS: 0,005 SLS	-1	18	18	18
42	Cobre 2,5ppm: Plata 2,5 ppm: Cinc 2,5 ppm	0,005 NaLS: 0,005 SLS	0	6	7	12

en comparación con lauroil sarcosinato sódico (NaLS), la presencia del SLS ayuda a mejorar y/o potenciar la solubilidad del NaLS en condiciones ácidas

Ejemplos 43 - 57 - Evaluación a concentración baja

- 5 Se realizó de nuevo una serie de experimentos para evaluar el rendimiento de diversas combinaciones de los componentes de las composiciones bioactivas de la presente invención, en este caso centrándose en el impacto de las concentraciones bajas de los componentes y sus combinaciones. En este conjunto de experimentos, se añadió 1 ml de soluciones acuosas de los componentes bioactivos/ácido cítrico a los frascos de 20 ml. Las formulaciones específicas evaluadas y los resultados de crecimiento de levadura se presentan en las Tablas 3 y 3A.
- 10 Como se ve en las Tablas 3 y 3A, una vez más la combinación de iones metálicos bioactivos, ácido cítrico y tensioactivo aniónico demostró una inhibición notable del crecimiento de levadura en comparación con los componentes individuales, incluso a las concentraciones bajas de tensioactivo y ácido en exceso. Aunque, una vez más, los tensioactivos parecían tener un efecto inhibidor mínimo, en comparación con los controles, por sí mismos, la inhibición fue insignificante en comparación con la de los sistemas de acuerdo con la presente invención.

Ejemplos 58 - 71 - Fuente de iones metálicos de intercambio iónico

- 20 Se preparó una solución de citrato metálico añadiendo aproximadamente 4 g de ácido cítrico a aproximadamente 8 granos de agua y se mezcló hasta que se disolvió completamente. A continuación, se añadieron 0,1 gramos de cada uno de los dos agentes antimicrobianos de tipo de intercambio iónico, AglON AC10D y AglON AK10D de AglON Technologies de Wakefield, MA, Estados Unidos, a la solución de ácido cítrico concentrada con agitación hasta que los agentes antimicrobianos se disolvieron completamente. Se añadieron después aproximadamente 92 gramos de agua para proporcionar una solución de ácido cítrico al 4 % que tenía disuelto en la misma AC10D 0,1 % en peso y AK10D 0,1 % en peso. AglON AK10D contiene aproximadamente el 5,0 % en peso de plata y aproximadamente el 13 % en peso de cinc y AglON AC10D contiene aproximadamente el 6,0 % en peso de cobre y aproximadamente el 3,5 % en peso de plata. Se añadieron después diversas cantidades de la solución de ácido cítrico formada de este modo a frascos de ensayo para proporcionar un contenido de plata en los frascos de ensayo de aproximadamente 1,25 ppm, 2,5 ppm, 5,0 ppm y 10 ppm. Adicionalmente, se añadieron diferentes tensioactivos y combinaciones de tensioactivos a ciertos frascos para demostrar el efecto de diferentes contenidos de metales y ácidos en la bioeficacia con y sin

Tabla 3

Ejemplo	Metal Bioactivo*	Ácido Cítrico (% en peso)	Tensioactivo** (% en peso)	Turbidez (UNT)				
				DO (T0)	DO (T1h)	DO (T18)	DO(T24)	DO(T48)
43			0,01 NaLS	43	45	550	613	521
44			0,02 NaLS	43	40	460	524	624
45			0,01 SLS	43	47	675	728	758
46			0,02 SLS	37	42	495	610	605
47			0,01 NaLS/0,01 SLS	40	41	370	466	580
48			0,005 NaLS/0,005 SLS	43	47	630	696	726
49		0,05		42	46	835	920	878
50		0,1		38	44	780	864	852
51	MI1	0,2		50	62	809	891	915
52	MI1	0,2	0,01 NaLS	64	63	67	68	69
53	MI1	0,2	0,01 SLS	61	65	300	569	1039

ES 2 394 476 T3

54	MI1	0,2	0,005 NaLS/0,005 SLS	60	63	62	63	73
----	-----	-----	----------------------	----	----	----	----	----

continuación)

Ejemplo	Metal Bioactivo*	Ácido Cítrico (% en peso)	Tensioactivo** (% en peso)	Turbidez (UNT)				
				DO (T0)	DO (T1h)	DO (T18)	DO(T24)	DO(T48)
55	MI1	0,2	0,01 NaLS/0,01 SLS	85	76	76	79	79
56	Control 1			43	51	960	997	939
57	Control 2			43	51	890	986	887

*MI1 una solución de ácido cítrico al 4 % que contiene 50 ppm de cada uno de Ag, Cu y Zn por ml que proporcionan (a 1 ml) ~ 5 ppm de cada uno en el frasco de ensayo

**NaLS - lauroil sarcosinato sódico, SLS - lauril sulfato sódico

Tabla 3A

Ejemplo	Metal Bioactivo*	Ácido Cítrico (% en peso)	Tensioactivo** (% en peso)	Cambio de Turbidez de T0 (delta UNT)			
				DO (T1h)	DO (T18)	DO(T24)	DO(T48)
43			0,01 NaLS	2	507	570	478
44			0,02 NaLS	-3	417	481	581
45			0,01 SLS	4	632	685	715
46			0,02 SLS	5	458	573	568
47			0,01 NaLS/0,01 SLS	1	330	426	540
48			0,005 NaLS/0,005 SLS	4	587	653	683
49		0,05		4	793	878	836
50		0,1		6	742	826	814
51	MI1	0,2		12	759	841	865
52	MI1	0,2	0,01 NaLS	-1	3	4	5
53	MI1	0,2	0,01 SLS	4	239	508	978
54	MI1	0,2	0,005 NaLS/0,005 SLS	3	2	3	13
55	MI1	0,2	0,01 NaLS/0,01 SLS	-9	-9	-6	-6
56	Control 1			8	917	954	896
57	Control 2			8	847	943	844

*MI1 una solución de ácido cítrico al 4 % que contiene 50 ppm de cada uno de Ag, Cu y Zn por ml que proporciona (a 1 ml) ~ 5 ppm de cada uno en el frasco de ensayo

**NaLS - lauroil sarcosinato sódico, SLS - lauril sulfato sódico

5

Tabla 4

Ejemplos	Concentración de Ag ppm	Tensioactivo* (% en peso)	Turbidez (UNT)					
			DO (T0)	DO (T1h)	DO (T18h)	DO (T24h)	DO (T44h)	DO (T120h)
58	1,25		108	128	913	880	954	1136
59	2,5		127	157	865	890	941	1024
60	5		176	199	229	227	234	721
61	10		168	173	191	191	190	180
62	1,25	0,005 NaLS	143	158	240	560	843	708
63	2,5	0,005 NaLS	180	179	204	210	729	843

ES 2 394 476 T3

64	5	0,005 NaLS	194	201	222	221	227	227
65	1,25	0,005 SLS	136	167	953	930	973	1132
66	2,5	0,005 SLS	201	212	880	880	967	1145

(continuación)

Ejemplos	Concentración de Ag ppm	Tensioactivo* (% en peso)	Turbidez (UNT)					
			DO (T cero)	DO (T1h)	DO (T18h)	DO (T24h)	DO (T44h)	DO (T120h)
67	5	0,005 SLS	248	247	272	272	296	297
68	1,25	0,0025 NaLS /0,0025 SLS	166	180	343	730	957	986
69	2,5	0,0025 NaLS /0,0025 SLS	215	217	235	239	759	940
70	5	0,0025 NaLS /0,0025 SLS	235	235	257	255	259	268
71	Control		101	125	1050	1050	1040	1183

*NaLS - lauroil sarcosinato sódico, SLS - lauril sulfato sódico

Tabla 4A

Ejemplo	Concentración de ppm Tensioactivo*	Ag	Tensioactivo* (% en peso)	Cambio de Turbidez (delta UNT)				
				DO (T1h)	DO (T18h)	DO (T24h)	DO (T44h)	DO (T120h)
58	1,25			20	805	772	846	1028
59	2,5			30	738	763	814	897
60	5			23	53	51	58	545
61	10			5	23	23	22	12
62	1,25		0,005 NaLS	15	97	417	700	565
63	2,5		0,005 NaLS	-1	24	30	549	663
64	5		0,005 NaLS	7	28	27	33	33
65	1,25		0,005 SLS	31	817	794	837	996
66	2,5		0,005 SLS	11	679	679	766	944
67	5		0,005 SLS	-1	24	24	48	49
68	1,25		0,0025 NaLS /0,0025 SLS	14	177	564	791	820
69	2,5		0,0025 NaLS /0,0025 SLS	2	20	24	544	725
70	5		0,0025 NaLS /0,0025 SLS	0	22	20	24	33
71	Control			24	949	949	939	1082

*NaLS - lauroil sarcosinato sódico, SLS - lauril sulfato sódico

5 tensioactivos. Las formulaciones específicas evaluadas y los resultados del crecimiento de levadura se presentan en las Tablas 4 y 4A.

10 Como se ha visto en las Tablas 4 y 4A, las composiciones de acuerdo con la presente invención proporcionaron una inhibición notable en el crecimiento de levaduras. Aunque el Ejemplo 61 que contenía la mayor concentración de iones metálicos (plata 10 ppm, cobre 7 ppm y zinc 15,3 ppm), mostró una buena inhibición del crecimiento de levadura, el mayor grado de eficacia se da con el aumento conjunto de la liberación de estos metales al ambiente.

15 Esto se hace especialmente importante cuando los materiales bioactivos deban usarse en o cerca de aplicaciones marinas y/o agrícolas. Por tanto, aunque altas concentraciones de metales, especialmente de plata, proporcionarán mejor bioeficacia, también aceleran el impacto en ambientes acuáticos. Por otro lado, como se ha visto en los ejemplos que emplean las soluciones ácidas que contienen metales antimicrobianos con el tensioactivo aniónico, especialmente lauroil sarcosinato sódico, solo o en combinación con lauril sulfato sódico, se consigue la misma o incluso mejor inhibición de levadura con menos de la mitad, incluso menos de un cuarto, de las concentraciones de iones metálicos. Además, estos resultados muestran que ajustando el nivel de tensioactivo, se puede reducir aún más el nivel de ión metálico proporcionando todavía una inhibición notable de los hongos.

También resulta sorprendente acerca de este ejemplo el hallazgo de que el ácido cítrico podría disolver las partículas de zeolita antimicrobianas. Este hallazgo presenta otro medio por el que las composiciones de la invención pueden realizarse así como varias aplicaciones alternativas para tales materiales no posibles de otro modo con las zeolitas en su forma sólida.

5 **Ejemplo 72 - 79 - Concentración de metales**

10 Para este estudio se preparó un sistema bioactivo concentrado (MI2) que comprendía una solución de ácido cítrico acuosa al 16 % que tenía disuelta en la misma citrato de plata, citrato de cobre y citrato de zinc, cada uno añadido en una cantidad para proporcionar 200 ppm de cada metal, junto con lauroil sarcosinato sódico 0,25 % y lauril sulfato sódico 0,32 %. Se añadieron diversas cantidades de este sistema a los frascos de ensayo para evaluar adicionalmente el impacto de la concentración de metales en la inhibición de levadura. Se preparó un ejemplo adicional incluyendo además un tensioactivo no iónico, Tween 20 (polioxietileno (20) sorbitán monolaurato), un emulsionante para evaluar su impacto en el rendimiento. Las formulaciones específicas evaluadas y los resultados se presentan en las Tablas 5 y 5A.

15 Como se ve en las Tablas 5 y 5A, las altas concentraciones de metales inhibieron drásticamente, si no detuvieron completamente, el crecimiento de levadura. Las soluciones de los Ejemplos 76, 77 y 78 que contenían contenido de metal extremadamente alto parecieron destruir las células de levadura, mostrando lo que parecía ser una rápida desnaturalización de la levadura al añadir el material bioactivo a los frascos de ensayo. Es probable que la turbidez inicial alta reflejara tanto la que surge de la adición de los materiales bioactivos en sí mismos como la destrucción de las células de levadura.

20

Tabla 5

Ejemplo	MI2* añadido (ml)	Concentración de cada metal (ppm)	Turbidez (UNT)					
			T0	T 18	T22	T24	T 64	T 82
72	0	0	63	920	980	964	1020	1050
73	0,1	1	81	608	722	820	1077	1062
74	0,25	2,5	111	126	142	160	752	810
75	0,5	5	145	198	208	208	205	203
76	1,0	10	483	410	395	369	320	300
77	2,0	20	1295	820	714	660	399	264
78	3,0	30	1435	766	620	555	340	340
79	0,5 ⁺	5	141	249	405	600	1116	1129

* MI2 una solución de ácido cítrico al 16 % que contiene 200 ppm de cada uno de Ag, Cu y Zn por ml

⁺ esta formulación también contenía Tween 20 0,1 % en peso, un tensioactivo no iónico

Tabla 5A

Ejemplo	MI2* (ml)	añadido	Concentración de cada metal (ppm)	Cambio de Turbidez (delta (UNT))				
				T18-T0	T22-T0	T24-T0	T64-T0	T82-T0
72	0	0	0	857	917	901	957	987
73	0,1	1	1	527	641	739	996	981
74	0,25	2,5	2,5	15	31	49	641	699
75	0,5	5	5	53	63	63	60	58
76	1,0	10	10	-73	-88	-114	-163	-183
77	2,0	20	20	-475	-581	-635	-896	-1031
78	3,0	30	30	-669	-815	-880	-1095	-1095
79	0,5 ⁺	5	5	108	264	459	975	988

* MI2 una solución de ácido cítrico al 16 % que contiene 200 ppm de cada uno de Ag, Cu y Zn por ml

⁺ esta formulación también contenía Tween 20 0,1 % en peso, un tensioactivo no iónico

25

Independientemente, los resultados muestran que también se obtiene una inhibición notable a concentraciones mucho más bajas del metal en presencia del ácido y el tensioactivo en exceso. De hecho, los metales de solo 15 ppm (5 ppm de cada uno) proporcionan excelente inhibición durante 82 horas y más.

Finalmente, la adición de tensioactivo Tween 20 pareció ser antagonista de la acción de los sistemas bioactivos de

la presente invención dando como resultado una reducción del nivel de la inhibición de levadura. Aun así, esta composición (Ejemplo 79) manifestó una inhibición de levadura moderada durante 24 horas. Dependiendo de la aplicación de uso final específica contemplada, resulta evidente que deberían realizarse evaluaciones preliminares rutinarias antes de formular con diversos aditivos para determinar su impacto en los sistemas de la invención de la presente invención.

Ejemplos 80-95 - Sinergia de los bioactivos

Se realizó una serie de experimentos en los que se evaluaron posibles sinergias entre las composiciones de la invención y otros materiales bioactivos así como entre tales otros materiales bioactivos que incluyen un fungicida, un agente antimicrobiano y un desinfectante. El sistema bioactivo de la invención empleado en este conjunto de experimentos (MI3) fue una solución de ácido cítrico acuosa al 4 % que contenía plata 50 ppm, cobre 50 ppm y zinc 50 ppm.

El fungicida evaluado fue Mancozeb en Suspensión con zinc de Bonide Products, Inc. de Oniskany, NY, Estados Unidos, un fungicida formulado comercial que contiene 37 % en peso de Mancozeb. Aunque la formulación específica del producto Mancozeb está patentada, como una formulación comercial también contendría ciertos tensioactivos para permitir su aplicación a plantas para aumentar la eficacia. Mancozeb es un polvo insoluble, dispersable que aumenta la turbidez de los líquidos a los que se añade. No obstante, en una evaluación separada, no reproducida aquí, se encontró que Mancozeb era capaz de controlar o inhibir el crecimiento de levadura a una concentración de aproximadamente $1,23 \times 10^{-3}$. La etiqueta indica su tasa de uso a $2,6 \times 10^{-3}$.

El activo antimicrobiano evaluado fue AglON AC10D, un aditivo de zeolita antimicrobiana disponible de AglON Technologies, Inc., de Wakefield, MA, Estados Unidos, que, como se ha indicado anteriormente, contiene el 6,0 % en peso de cobre y el 3,5 % en peso de plata. En una evaluación de dilución separada, no reproducida aquí, se encontró que una suspensión acuosa de AC10D mostraba algo de control o inhibición de levaduras a una concentración de aproximadamente $6,25 \times 10^{-4}$.

Finalmente, el desinfectante evaluado fue AglON SilverClene 24, un material desinfectante a base de una solución acuosa de citrato de plata generado de forma electrolítica (plata ~ 30 ppm), también distribuida por AglON Technologies, Inc. Aunque está patentado, se cree que este producto y su fabricación se desvelan en Arata - documento US 6.583.176.

Los materiales anteriormente mencionados así como diversas combinaciones de los mismos se evaluaron para evaluar su eficacia para detener o inhibir el crecimiento de levaduras. Las formulaciones específicas ensayadas y los resultados de inhibición de levadura conseguidos con ellas se presentan en las Tablas 6 y 6A.

Tabla 6

Ejemplo	Amt MI3 (ml)	Mancozeb (% en peso)	AglON AC10D (% en peso)	SilverClene 24 (ml)	Tensioactivo (% en peso)	DO T cero	T(1 hora)	T(18 horas)	T(24 horas)	pH
80		9,40E-05				262	293	1023	1030	3,07
81	1	9,40E-05				276	276	309	522	2,91
82	2	9,40E-05				301	301	308	312	2,55
83	2	1,88E-04			0,05 NaLS/0,05 SLS	350	362	362	362	
84	2	3,75E-04				656	640	1001	1170	2,4
85	1	9,40E-05			0,05 SLS	331	321	328	330	2,48
86	hasta pH 6	3,75E-04			0,05 NaLS/0,05 SLS	609	605	825	968	4,91
87		1,88E-04	7,81E-05		0,05 NaLS	410	385	443	511	
88	2	1,88E-04	7,81 E-05		0,05 NaLS/0,05 SLS	521	435	435	440	2,68
89		9,40E-05		1		258	276	970	962	2,67
90		1,88E-04		2		365	364	782	1048	
91			3,90E-05			128	151	862	800	3,23
92	2		3,90E-05		0,05 SLS	154	156	172	175	2,54
93	2		1,56E-04		0,05 NaLS/0,05 SLS	190	143	148	156	2,66
94	2				0,05 NaLS/0,05 SLS	157	67	189	195	2,51
95	Control					73	98	898	856	3,25

Tabla 6A

Ejemplo	Amt MI3 (ml)	Mancozeb (% en peso)	AgION AC10D (% en peso)	SilverClene 24 (ml)	Tensioactivo (% en peso)	Cambio de Turbidez (delta (UNT))				
						1 hora	18 horas	1-18 horas	24 horas	1-24 horas
80		9,40E-05				31	761	730	768	737
81	1	9,40E-05				0	33	33	246	246
82	2	9,40E-05				0	7	7	11	11
83	2	1,88E-04			0,05 NaLS/0,05 SLS	12	12	0	12	0
84	2	3,75E-04				-16	345	361	514	530
85	1	9,40E-05			0,05 SLS	-10	-3	7	-1	9
86	hasta pH 6	3,75E-04			0,05 NaLS/0,05 SLS	-4	216	220	359	363
87		1,88E-04	7,81E-05		0,05 NaLS	-25	33	58	101	126
88	2	1,88E-04	7,81E-05		0,05 NaLS/0,05 SLS	-86	-86	0	-81	5
89		9,40E-05		1		18	712	694	704	686
90		1,88E-04		2		-1	417	416	683	682
91			3,90E-05			23	734	711	672	649
92	2		3,90E-05		0,05 SLS	2	18	16	21	19
93	2		1,56E-04		0,05 NaLS/0,05 SLS	-47	-42	5	-34	13
94	2				0,05 NaLS/0,05 SLS	-90	32	122	38	128
95	Control					25	825	800	783	758

Los resultados presentados en la Tabla 6 y 6A demuestran una notable sinergia entre las composiciones de la invención de acuerdo con la presente invención y fungicidas y agentes antimicrobianos comerciales. Específicamente, por ejemplo, una comparación de los resultados para los Ejemplos 80, 81 y 82 demuestra que la combinación de cantidades bajas de los iones metálicos, ácido cítrico y fungicida proporciona excelente rendimiento antifúngico. Aunque se observa que estas formulaciones no tienen tensioactivo adicional, el fungicida comercial en sí mismo contenía tensioactivos que actuaban en combinación con los iones metálicos y ácido cítrico para proporcionar los beneficios debidos a la combinación que se reivindica ahora. Estos resultados muestran que puede conseguirse excelente actividad antifúngica, como se mide por inhibición del crecimiento de levadura, con menos del 10 % de la cantidad de fungicida necesario para inhibir el crecimiento de levadura mediante la simple adición de niveles bajos de ácido e iones metálicos. Como se ve a partir de los Ejemplos 91, 92 y 93, se muestra una sinergia similar para las composiciones de la invención en combinación con un agente antimicrobiano inorgánico convencional. Aquí también, menos del 10 % de la cantidad del agente antimicrobiano necesario cuando se usa solo, proporcionó buen rendimiento antimicrobiano cuando estaba en combinación con niveles bajos de la composición bioactiva de acuerdo con la presente invención. Sin embargo, la sustitución de la composición de la invención por el SilverClene 24 de la presente invención, Ejemplos 89 y 90, no proporcionó beneficio aparente a pesar del contenido relativamente alto de plata.

Finalmente, en el Ejemplo 86, se añadió amoníaco a una parte de la solución MI3 hasta que la solución alcanzó un pH de 6. Se emplearon después en el experimento 2 ml de esta solución tamponada. Este ejemplo indica la importancia del pH bajo de las composiciones de acuerdo con la presente invención para proporcionar rendimiento deseable.

Ejemplos 96-107 - Sinergia de Immunox

Se realizó un estudio similar para evaluar la sinergia entre las composiciones bioactivas de acuerdo con la presente invención y un segundo fungicida, Immunox, un fungicida comercial que contiene el 1,55 % de miclobutanil,

disponible de Spectrum Brands Division of United Industries de Madison, WI, Estados Unidos. Como una formulación comercial, también se espera que este tenga algo de contenido de tensioactivos. La composición bioactiva empleada en ese experimento fue el sistema bioactivo concentrado (MI2) producido en los Ejemplos 72-79 anteriores. Las diluciones específicas de cada uno y los resultados obtenidos por los mismos se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7

Relación de dilución							
Ejemplo	Immunox	MI2	T cero	DO T1,5	T 18	DO T68	Delta 68
96		1:80	150	152		832	682
97		1:200	106	112		980	874
98	1:64		97	107	1043		
99	1:128		111	119	1126		
100	1:256		84	131		1170	1086
101	1:512		81	140		1240	1159
102	1:256	1:80	138	141		268	130
103	1:256	1:200	102	114		1037	935
104	1:512	1:80	138	140		292	154
105	1:512	1:200	97	110		1031	934
106	Control 1		86	175		754	668
107	Control 2		87	176		1180	1093

Como se indica en la Tabla 7, ninguno de los frascos de ensayo que contenían los niveles bajos de cada una de las composiciones bioactivas o la dilución de Immunox proporcionó actividad antifúngica durante el periodo de 96 horas completo ensayado. Además, ni la dilución 1:128 (Ejemplo 99) ni la dilución 1:64 (Ejemplo 98) de Immunox proporcionaron ninguna medida de eficacia, incluso en el periodo de ensayo más corto de 18 horas, a pesar del hecho de que el fabricante generalmente recomienda una dilución de 1:64. De forma similar, los Ejemplos 103 y 105 que tienen una dilución 1:200 de la composición bioactiva (aproximadamente 1 ppm de cada metal, 0,08 % de ácido cítrico, NaLS 0,00125 y SLS 0,0016) en combinación con las dos diluciones del Immunox no demostraron bioeficacia mientras que las combinaciones de ambas diluciones del Immunox con un nivel ligeramente más alto, dilución 1:80, de la composición bioactiva (~ 2,5 ppm de cada metal, 0,2 % de ácido cítrico, NaLS 0,003 y SLS 0,004) demostraron bioeficacia. Esto demuestra una sinergia entre las dos composiciones puesto que la dilución 1:80 por sí sola no mostró bioeficacia durante el periodo completo ensayado.

Ejemplos 108-126 – Fuentes metálicas

Se realizó una serie de experimentos usando diferentes sales metálicas como las fuentes de iones metálicos. Aquí, se añadieron cantidades suficientes de nitrato de plata, sulfato de cobre y óxido de zinc a una solución de ácido cítrico acuosa al 5 % para proporcionar 31,75 ppm de plata, 12,5 ppm de cobre y 40,17 ppm de zinc. Se añadieron diferentes cantidades de esta solución madre de concentrado (MI4) a los frascos de ensayo para evaluar la eficacia. Las formulaciones específicas, incluyendo las ppm resultantes de cada metal en el frasco de ensayo, así como los resultados de los mismos en la inhibición del crecimiento de levadura fueron como se presenta en las Tablas 8 y 8A.

Los resultados mostrados en las Tablas 8 y 8A demuestran que la selección de la fuente de iones metálicos no es crítica siempre que sea fácilmente soluble y sea soluble en el grado necesario para proporcionar el nivel deseado de concentración de iones metálicos en la solución. Además, los resultados demuestran la bioeficacia incluso a contenidos de ácido y metal extremadamente bajos. Aunque la eficacia es de duración relativamente corta a las concentraciones más bajas, se encuentra bioeficacia a largo plazo con apenas pequeños ajustes en la concentración relativa de los componentes necesarios. Además, dependiendo de la aplicación última de uso final, dicha eficacia antifúngica a corto plazo puede ser suficiente; permitiendo de este modo minimizar cualquier contaminación ambiental de la aplicación general de estos materiales.

Los resultados también sugieren que el lauril sulfato sódico puede ser ineficaz por sí mismo para promover la bioeficacia de las composiciones bioactivas de la presente invención. No obstante, su presencia puede ser deseable cuando el tensioactivo eficaz no es fácilmente soluble en el sistema acuoso. Por otro lado, su presencia o la presencia de tensioactivos similares puede no ser importante cuando la intención es producir sistemas no acuosos. Por ejemplo, los sistemas para aplicar como una emulsión en agua o como un aceite que se propagará en un medio acuoso al que se aplique, por ejemplo, un arrozal, pueden incluir tensioactivos que sean menos hidrófilos y más lipófilos.

Ejemplos 127-143 – Ácido láctico

5 Se realizó una serie de experimentos similares a los anteriores con la excepción de que se sustituyó ácido cítrico con ácido láctico. Por lo tanto, la composición bioactiva (MI5) comprendía suficientes cantidades de nitrato de plata, sulfato de cobre y óxido de zinc disuelto en una solución de ácido láctico acuosa al 5 % para proporcionar 31,75 ppm de plata, 12,5 ppm de cobre y 40,17 ppm de zinc. Las formulaciones específicas ensayadas y los resultados obtenidos con las mismas fueron como se presentan en las Tablas 9 y 9A.

Tabla 8

Ejemplo	Volumen de M14 añadido	Concentración de Metales			Tensioactivo % (p/p)		T cero	T2	Turbidez (UNT)				T48	T6
		Ag ppm	Cu ppm	Zn ppm	NaLS	SDS			T18	T28	T44	T6		
108	0,5	0,79	0,31	1,00			81	129	950	1048	1046	1046	1046	1054
109	1	1,59	0,63	2,01			85	136	950	997	1055	990	990	1023
110	2	3,18	1,25	4,02			112	158	916	930	960	930	930	970
111	3	4,76	1,88	6,03			126	158	760	799	810	830	830	844
112	0,5	0,79	0,31	1,00	0,005		140	143	179	307	919	936	936	980
113	1	1,59	0,63	2,01	0,005		140	137	143	152	279	306	306	468
114	2	3,18	1,25	4,02	0,005		180	174	174	177	244	252	252	282
115	3	4,76	1,88	6,03	0,005		187	185	184	184	184	184	184	272
116	0,5	0,79	0,31	1,00			83	132	948	1054	1066	1078	1078	1097
117	1	1,59	0,63	2,01			97	136	911	1003	1100	1060	1060	1075
118	2	3,18	1,25	4,02			116	147	746	907	970	1001	1001	1006
119	3	4,76	1,88	6,03			124	158	504	701	840	868	868	916
120	0,5	0,79	0,31	1,00			140	140	250	640	1065	1088	1088	1133
121	1	1,59	0,63	2,01	0,0025		149	149	160	256	930	901	901	1014
122	2	3,18	1,25	4,02	0,0025		164	177	174	174	291	459	459	804
123	3	4,76	1,88	6,03	0,0025		176	179	177	181	320	445	445	736
124	2	3,18	1,25	4,02	0,01		162	162	162	163	163	164	164	164
125	0,86	1,37	0,54	1,73	0,01		150	140	140	140	186	208	208	254
126							78	113	877	866	878	865	865	898

Tabla 8A

Ejemplo	Volumen de MI4 añadido	Concentración de Metales			Tensioactivo % (p/p)		Delta T2-T0	Cambio de turbidez (delta UNT)				
		Ag ppm	Cu ppm	Zn ppm	NaLS	SDS		D T18-T0	D T26-T0	D T44-T0	D T48-T0	D T68-T0
108	0,5	0,79	0,31	1,00			48	869	965	965	965	973
109	1	1,59	0,63	2,01			51	865	912	970	905	938
110	2	3,18	1,25	4,02			48	804	818	848	818	858
111	3	4,76	1,88	6,03			32	624	673	684	704	718
112	0,5	0,79	0,31	1,00	0,005		3	39	167	779	796	840
113	1	1,59	0,63	2,01	0,005		-3	3	12	139	166	328
114	2	3,18	1,25	4,02	0,005		-8	-6	-3	64	72	102
115	3	4,78	1,88	6,03	0,005		-2	-3	-3	-3	-3	85
116	0,5	0,79	0,31	1,00		0,005	49	865	971	983	995	1014
117	1	1,59	0,63	2,01		0,005	39	814	906	1003	963	978
118	2	3,18	1,25	4,02		0,005	31	630	791	854	885	890
119	3	4,76	1,88	6,03		0,005	32	380	577	716	744	792
120	0,5	0,79	0,31	1,00		0,0025	0	110	500	925	948	993
121	1	1,59	0,63	2,01		0,0025	0	11	107	781	752	865
122	2	3,18	1,25	4,02		0,0025	13	10	10	127	295	640
123	3	4,78	1,88	6,03		0,0025	3	1	5	144	269	560
124	2	3,18	1,25	4,02		0,01	0	0	1	1	2	2
125	0,86	1,37	0,54	1,73		0,01	-10	-10	-10	36	58	104
126							35	799	788	800	787	820

Tabla 9

Ejemplo	Volumen de MI4 añadido	Concentración de Metales			Tensioactivo % (p/p)		Turbidez (UNT)				
		Ag ppm	Cu ppm	Zn ppm	NaLS	SDS	T cero	T1	T18	T24	T44
127	0,5	0,79	0,31	1,00			107	130	1000	1111	1001
128	1	1,59	0,63	2,01			109	130	1006	1021	1016
129	2	3,18	1,25	4,02			148	154	970	995	1014
130	3	4,76	1,88	6,03			178	202	914	925	990
131	0,5	0,79	0,31	1,00	0,005		134	170	300	454	923
132	1	1,59	0,63	2,01	0,005		153	169	200	227	292
133	2	3,18	1,25	4,02	0,005		218	217	207	204	228
134	3	4,76	1,88	6,03	0,005		222	223	222	215	227
135	0,5	0,79	0,31	1,00		0,005	120	145	1074	1111	1079
136	1	1,59	0,63	2,01		0,005	140	156	1050	1092	1110
137	2	3,18	1,25	4,02		0,005	179	193	945	1031	1080
138	3	4,76	1,88	6,03		0,005	223	239	690	977	1180
139	0,5	0,79	0,31	1,00	0,0025	0,0025	143	151	884	968	1170
140	1	1,59	0,63	2,01	0,0025	0,0025	175	175	237	330	1110
141	2	3,18	1,25	4,02	0,0025	0,0025	210	214	207	223	730
142	3	4,76	1,88	6,03	0,0025	0,0025	240	240	228	228	475
143	control						100	139	1175	1163	1170

Tabla 9A

Ejemplo	Volumen de MIS añadido	Concentración de Metales			Tensioactivo % (p/p)		Cambio de turbidez (delta UNT)			
		Ag ppm	Cu ppm	Zn ppm	NaLS	SDS	D T1- T0	D T18- T10	DT24- T0	DT44- T0
127	0,5	0,79	0,31	1,00			23	893	1004	894
128	1	1,59	0,63	2,01			21	897	912	907
129	2	3,18	1,25	4,02			8	822	847	866
130	3	4,76	1,88	6,03			24	736	747	812
131	0,5	0,79	0,31	1,00	0,005		36	166	320	789
132	1	1,59	0,63	2,01	0,005		16	47	74	139
133	2	3,18	1,25	4,02	0,005		-1	-11	-14	10
134	3	4,76	1,88	6,03	0,005		1	0	-7	5
135	0,5	0,79	0,31	1,00		0,005	25	954	991	959
136	1	1,59	0,63	2,01		0,005	16	910	952	970
137	2	3,18	1,25	4,02		0,005	14	766	852	901
138	3	4,76	1,88	6,03		0,005	16	467	754	957
139	0,5	0,79	0,31	1,00	0,0025	0,0025	8	741	825	1027
140	1	1,59	0,63	2,01	0,0025	0,0025	0	62	155	935
141	2	3,18	1,25	4,02	0,0025	0,0025	4	-3	13	520
142	3	4,76	1,88	6,03	0,0025	0,0025	0	-12	-12	235
143	control						39	1075	1063	1070

5 Los resultados como se muestran en las Tabla 9 y 9A, se asemejan a los hallados en el conjunto de experimentos anterior lo que indica que la invención puede traducirse a ácidos de características similares.

Ejemplos 144-156 – Ácido fosfórico

Se prepararon dos soluciones madre para evaluación en las que el ácido empleado fue ácido fosfórico. En la primera se añadió citrato de plata, citrato de cobre y citrato de zinc a una solución de ácido fosfórico acuosa al 16 % para

5 proporcionar 200 ppm de cada metal. Se preparó una segunda solución madre usando nitrato de plata, sulfato de cobre y óxido de zinc, de nuevo en la solución de ácido fosfórico al 16 % para proporcionar 200 ppm de cada metal. Ambas composiciones contenían además un 0,32 % de tensioactivo, como un tensioactivo individual o como una mezcla 50:50. Las formulaciones específicas y los resultados de su eficacia en el control del crecimiento de levadura fueron como se presentan en las Tablas 10 y 10A.

Los resultados como se muestran en las Tablas 10 y 10A sugieren que el tensioactivo puede no ser crítico en las composiciones en las que el ácido en exceso es un ácido de fuerte a moderado, tal como ácido fosfórico.

Ejemplos 157-166 – Ácido nítrico

10 Para demostrar adicionalmente la amplitud de las composiciones bioactivas, se empleó un ácido mineral relativamente fuerte, ácido nítrico, como el componente ácido. Se preparó una solución madre combinando 78,7 mg de nitrato de plata, 62,2 mg de óxido de zinc y 200 mg de sulfato de cobre con 20 ml de agua purificada y 1,5 g de ácido nítrico concentrado (68 %) en agitación constante. Una vez que los sólidos se disolvieron, se añadió agua purificada adicional para componer un volumen de 250. Como se preparó, esta mezcla contenía aproximadamente 200 ppm de cada metal, según se calcula. El pH se midió y se encontró que era de 1,66. La mezcla se dividió
15 después en tres alícuotas de aproximadamente el mismo volumen. Se apartó una alícuota y las otras dos se sometieron a ajuste de pH con hidróxido de amoníaco. La cantidad de hidróxido de amoníaco que se añadió fue la necesaria para llevar el pH de la primera alícuota hasta 2,55 y de la segunda alícuota hasta 3,63.

20 Después se evaluó cada solución, con y sin tensioactivos, para evaluar su bioeficacia en la inhibición del crecimiento de levadura. La cantidad de cada una de las tres alícuotas añadida al frasco de 20 ml de la suspensión de levadura se

Tabla 10

Ejemplo	Fuente de Metal	Metal (ppm)	Tensioactivos (ppm)	Turbidez (UNT)							
				T cero	T 1 hora	T18	T24	T42	T48	T72	T96
144	Sales de citrato*	2,5		123	134	300	400	1046	1094	1146	1106
145	Sales de citrato*	5		199	180	166	166	160	163	162	154
146	Sales de citrato*	10		211	193	176	176	172	177	172	169
147	AgNO3, CuSO4,ZnO	2,5		168	166	179	179	172	174	778	1162
148	AgNO3, CuSO4,ZnO	5		209	193	180	180	175	174	170	168
149	AgNO3, CuSO4,ZnO	10		228	219	197	197	196	204	199	194
150	Sales de citrato*	5	0,05 SLS	226	218	200	200	193	203	192	186
151	Sales de citrato*	5	0,05 NaLS	258	254	216	216	200	205	197	185
152	Sales de citrato*	5	0,05 SLS/0,05 NaLS	253	237	200	200	204	208	201	188
153	AgNO3, CuSO4,ZnO	5	0,05 SLS	285	263	229	229	223	229	214	206
154	AgNO3, CuSO4,ZnO	5	0,05 NaLS	280	273	226	222	216	213	208	184
155	AgNO3, CuSO4,ZnO	5	0,05 SLS/0,05 NaLS	283	272	250	247	232	238	232	215
156	Control			52	53	437	599	938	913	877	886

* citrato de Ag, citrato de Cu y citrato de Zn, cada uno al nivel designado

Tabla 10A

Ejemplo	Fuente de Metal	Metal (ppm)	Tensioactivo (ppm)	Cambio de Turbidez (delta UNT)						
				T1-T0	T18-T1	T24-T1	T42-T1	T48-T1	T72-T1	T96-T1
144	Sales de citrato*	2,5		11	166	266	912	960	1012	972
145	Sales de citrato*	5		-19	-14	-14	-20	-17	-18	-26
146	Sales de citrato*	10		-18	-17	-17	-21	-16	-21	-24
147	AgNO3, CuSO4,ZnO	2,5		-2	13	13	6	8	612	996
148	AgNO3, CuSO4,ZnO	5		-16	-13	-13	-18	-19	-23	-25
149	AgNO3, CuSO4,ZnO	10		-9	-22	-22	-23	-15	-20	-25
150	Sales de citrato*	5	0,05 SLS	-8	-18	-18	-25	-15	-26	-32
151	Sales de citrato*	5	0,05 NaLS	-4	-38	-38	-54	-49	-57	-69
152	Sales de citrato*	5	0,05 SLS/0,05 NaLS	-16	-37	-37	-33	-29	-36	-49
153	AgNO3, CuSO4,ZnO	5	0,05 SLS	-22	-34	-34	-40	-34	-49	-57
154	AgNO3, CuSO4,ZnO	5	0,05 NaLS	-7	-47	-51	-57	-60	-65	-89
155	AgNO3, CuSO4,ZnO	5	0,05 SLS/0,05 NaLS	-11	-22	-25	-40	-34	-40	-57
156	Control			1	384	546	885	860	824	833

5 expone en la Tabla 11 junto con la cantidad de tensioactivo añadido, cuando se indique. El tensioactivo empleado fue una mezcla 50:50 de lauril sulfato sódico y lauroil sarcosinato sódico. Las formulaciones específicas ensayadas y los resultados de los resultados de las mismas se presentan en la Tabla 11. Como puede verse a partir de la Tabla 11, la combinación de metal y ácido no proporcionó ninguna inhibición en los niveles ensayados. Sin embargo, cuando se añadió el tensioactivo, se manifestó bioeficacia incluso a la concentración de metal/ácido menor.

Tabla 11 - Ácido Nítrico

Ejemplo	Volumen de MI6 Añadido	Metales (ppm)	Tensioactivo % (p/p)	pH	Turbidez/Cambio de Turbidez				
					T0	T18	T18-T0	T42	T42-T0
157	0,5	5		1,66	69	1243	1174	1133	1064
158	0,5	5		2,55	67	1245	1178	1133	1066
159	0,5	5		3,63	69	1243	1174	1150	1081
160	1	10		1,66	65	976	911	1162	1097
161	1	10		2,55	66	1012	946	1186	1120
162	1	10		3,63	67	1036	969	1166	1099
163	0,5	5	0,05	1,66	61	55	-6	58	-3
164	0,5	5	0,05	2,55	62	53	-9	55	-7
165	0,5	5	0,05	3,63	60	57	-3	52	-8
166	0				67	1255	1188	1212	1145

Ejemplo 167-222 – Evaluación de tensioactivos

10 Se realizó una serie de experimentos para explorar diversos tensioactivos con respecto a eficacia de acuerdo con la presente invención. Los tensioactivos se evaluaron como un aditivo puro (0 ppm de metales) o en combinación con 1 ml o 2 ml de una solución de ácido cítrico al 4 % que contenía 50 ppm de cada uno de cobre, plata y cinc. Con la adición de 1 ml de la solución de ácido cítrico, el frasco de ensayo de la suspensión de levadura tendrá aproximadamente el 0,2 % de ácido cítrico y aproximadamente 2,5 ppm de cada metal. Con la adición de 2 ml de la solución de ácido cítrico, el ácido es aproximadamente el 0,4 % y los metales están cada uno presente a aproximadamente 5 ppm en los frascos de ensayo. Cada tensioactivo se evaluó a una concentración de aproximadamente el 0,05 % en peso. Los controles también se evaluaron con y sin los metales.

15

Los tensioactivos específicos evaluados así como las formulaciones de cada composición de ensayo junto con los resultados de los mismos se exponen en la Tabla 12.

Tensioactivos	Química de tensioactivos	Fuente	Tipo	Metal ppm	T0	T18	T48	T72	T96	T18-T0	T48-T0	T72-T0	T96-T0
Pluronic L82	Copolímero en bloque EO-PO	BASF	No iónico	0	47	1088	1113	1142	1158	1041	1066	1095	1109
				2,5	343	378	382	384	340	33	19	2	-24
				5	118	1127	1138	1175	1148	1009	1020	1057	1028
Hampopsyl L95	Na Tauroil sarcosinato sódico	Hampshire Chemical	Aniónico	0	47	42	390	884	878	-5	343	837	831
				2,5	70	909	999	1037	983	839	929	987	913
				5	407	444	442	440	440	37	35	33	33
Lauril sulfato sódico	Lauril sulfato sódico	VWR Sdentific	Aniónico	0	48	495	858	842	639	447	810	594	591
				2,5	88	90	88	88	87	2	0	0	-1
				5	231	244	233	238	232	13	2	7	1
Witco	Lauril éter sulfato sódico molar (2 EO)	Witco Chemical	Aniónico	0	48	1060	1021	957	923	1012	973	909	875
				2,5	73	819	1415	1436	1447	748	1342	1383	1374
				5	140	143	448	870	915	3	308	730	775
Jeenterie CAPB LC	Cocamidopropil betaina	Jeen International Corp	Anfotérico	0	48	845	657	882	482	597	809	834	414
				2,5	93	90	91	90	88	-3	-2	-3	-5
				5	204	204	202	202	202	0	-2	-2	-2
Manckinate LO100DLSS	Dilauril sulfosuccinato	Mackintire Chemical	Anfotérico	0	95	1020	888	817	788	925	771	722	693
				2,5	118	97	108	1185	1317	-21	-12	1047	1199
				5	251	239	232	224	215	-12	-19	-27	-36
Ammonyx LO	Óxido de lauril dimetilamina	Stepan Chemical	No iónico	0	44	28	35	45	28	-16-9		1	-16
				2,5	972	390	118	115	105	-582-854		-857	-887
				5	852	314	252	227	180	-338	-400	-425	-472
Hamposyl C30	Na N-cocoil Sarcosinato	Hampshire Chemical	Aniónico	0	44	207	1043	1041	1037	183	999	997	993
				2,5	699	677	857	873	1115	-22	-42	-26	418
				5	510	554	570	503	693	44	88	79	83
Hamposyl M30	Na N-miristoil Sarcosinato	Hampshire Chemical	Aniónico	0	48	28	152	1205	1184	-18	106	1159	1138

(continuación)													
Tensioactivos	Química de tensioactivos	Fuente	Tipo	Metal ppm	T0	T18	T48	T72	T96	T18-T0	T48-T0	T72-T0	T96-T0
Hampshire TL	TEA lauroil Glutamato	Hampshire Chemical	Aniónico	0	88	946	977	927	905	880	911	881	839
Glutamato				2,5	182	410	1143	1189	1178	228	981	1007	996
				5	218	618	1104	1129	1182	400	888	911	944
Tergito15S3	Alcohol Etoxilato secundario	Dow Chemical	No iónico	0	188	1140	1178	969	880	952	990	781	692
				2,5	180	340	1247	1227	1134	160	1087	1047	954
				5	317	818	1350	1297	1289	501	1033	980	972
Tergitol15S7	Alcohol etoxilato secundario	Dow Chemical	No iónico	0	48	885	1077	788	577	817	1029	718	*529
				2,5	91	117	1152	1087	917	28	1081	996	828
				5	197	408	1291	1224	1217	211	1094	1027	1020
Tergitol TMN8	Alcohol etoxilato secundario ramificado	Dow Chemical	No iónico	0	50	940	1128	784	614	890	1078	734	564
				25	108	132	1184	1140	1048	26	1078	1034	942
				5	215	480	1300	1275	1266	285	1085	1080	1051
Tergitol TMN3	Alcohol etoxilato secundario ramificado	Dow Chemical	No iónico	0	49	314	1015	700	541	265	966	851	492
				2,5	92	94	1054	1014	878	2	962	922	784
				5	189	247	1100	1128	1128	58	911	939	839
Sulfonic TDA3B	Alcohol etoxilado C1-C14	Huntsman Chemical	No iónico	0	208	1183	1183	948	809	957	977	742	803
				2,5	280	372	1298	1248	1192	112	1038	988	932
				5	359	725	1369	1366	1319	368	1010	1007	960
Tween 20	Polioxietilen (20) sorbitán monolaurato		No iónico	0	57	1077	1148	1087	730	1020	1061	1030	673
				2,5	92	932	1118	887	719	840	1024	775	627

(continuación)

Tensioactivos	Química de tensioactivos	Fuente	Tipo	Metal ppm	T0	T18	T48	T72	T96	T18-T0	T48-T0	T72-T0	T96-T0
Plantaren 2000	Alquil poliglicósido	Cognis	No iónico	5.0	169	1080	1144	1105	1048	911	975	936	879
				2,5	56	348	908	782	842	308	850	728	588,
				5	102	410	660	1104	1323	8	558	1002	1221
Control				0	229	235	232	232	237	8	3	3	8
Control (2,5 ppm)				0	58	1171	1152	1188	1177	1113	1094	1110	1119
Control (5 ppm)				0	94	968	1073	1180	1041	874	979	1086	947
Metales Control				0	132	1196	1185	1228	1233	1064	1053	1096	1101
Metales Control				2,5	93	1001	1080	1128	982	908	987	1035	869
Metales Control				5	152	1160	1188	1228	1193	1008	1034	1078	1041

5 Como se ve en la Tabla 12, los beneficios de la presente invención se consiguen con una amplia serie de materiales tensioactivos. Especialmente se prefieren los tensioactivos que están sin o sustancialmente sin unidades de óxido de etileno repetidas y/o que tienen pesos moleculares de moderados a bajos. A pesar de lo anterior, se observa que se obtuvieron buenos resultados con el Pluronic L62, un tensioactivo que contiene óxido de polietileno, cuando se usa en combinación con el nivel más bajo de ácido y metales. Se cree que el nivel de ácido más alto puede haber afectado a la estabilidad de este material, y posiblemente a materiales similares.

Ejemplos 223-236 – Comparación de estrobilurina

10 Se realizó una serie de experimentos para evaluar el rendimiento comparativo de las composiciones bioactivas de la presente invención y varios fungicidas basados en estrobilurina comerciales. Se usaron dos formulaciones bioactivas. La primera, MI2, comprendía una solución de ácido cítrico acuosa al 16 % que tenía disuelto en la misma citrato de plata, citrato de cobre y citrato de cinc, añadiéndose cada uno en una cantidad para proporcionar 200 ppm de cada metal, junto con el 0,25 % de lauroil sarcosinato sódico y el 0,42 % de lauril sulfato sódico como se ha indicado anteriormente. La segunda, MI7, comprendía una dilución 160:1 de una solución de ácido fosfórico acuosa al 16 % que tenía disuelta en la misma citrato de plata, citrato de cobre y citrato de cinc, añadiéndose cada uno en una cantidad para proporcionar 200 ppm de cada metal en la solución de ácido fosfórico. Cada fungicida se evaluó a diferentes niveles. Las formulaciones específicas ensayadas y los resultados obtenidos con las mismas se presentan en las Tablas 13 y 13A.

20 Como se ha visto en las Tablas 13 y 13A, las composiciones bioactivas de la presente invención proporcionaron inhibición notable del crecimiento de levadura, incluso a las concentraciones más bajas, aproximadamente 5 ppm de cada ión metálico. Por otro lado, ninguna excepto dos de las formulaciones fungicidas basadas en estrobilurina ensayadas demostró ninguna bioeficacia significativa contra levadura durante el periodo de tiempo ensayado. Las dos formulaciones que proporcionaron buena inhibición estaban a cargas comparativamente altas.

Ejemplos 237-250 – sinergia de estrobilurina

25 A la luz del bajo rendimiento anterior de las estrobilurinas en general, se realizó una serie de experimentos para evaluar la sinergia potencial entre las composiciones bioactivas de la presente invención y los fungicidas basados en estrobilurina comerciales anteriores. Las composiciones empleadas

Tabla 13

Ejemplo	Fungicida	Volumen añadido	Turbidez (UNT)				
			T0	T1	T 18	T26	T50
223	Quadris ^a	1	384	393	1066	1139	1134
224		2	767	772	1264	1311	1315
225		5	1332	1332	1364	1377	1376
226	Flint ^b	1	418	424	1115	1208	1234
227		2	718	708	1141	1299	1327
228		5	1210	1210	1270	1265	1245
229	Headline ^c	1	232	225	961	1114	1137
230		2	387	391	1066	1134	1199
231		5	717	747	1178	1222	1241
232	MI2	0,5	128	129	154	177	174
233	MI2	1	414	384	366	366	352
234	MI7	0,5	249	244	248	248	242
235	MI7	1	311	302	283	283	277
236	Control		67	68	793	871	904

a - Fungicida Quadris de Syngenta Crop Protections, Inc. de Greensboro, NC, Estados Unidos

b - Fungicida Flint de Bayer CropScience LP de Research Triangle Park, NC, Estados Unidos

c - Headline de BASF Corporation de Research Triangle Park, NC, Estados Unidos

ES 2 394 476 T3

Tabla 13A

Ejemplo	Fungicida	Volumen añadido	Cambio de turbidez (delta UNT)		
			T18-T1	T26-T1	T50-T1
223	Quadris ^a	1	673	746	741
224		2	492	539	543
225		5	32	45	44
226	Flint ^b	1	691	784	810
227		2	433	591	619
228		5	60	55	35
229	Headline ^c	1	736	889	912
230		2	675	743	808
231		5	431	475	794
232	MI2	0,5	25	48	45
233	MI2	1	-18	-18	-32
234	MI7	0,5	4	4	-2
235	MI7	1	-19	-19	-25
236	Control		725	803	836

a - Fungicida Quadris de Syngenta Crop Protections, Inc. de Greensboro, NC, Estados Unidos
b - Fungicida Flint de Bayer CropScience LP de Research Triangle Park, NC, Estados Unidos
c - Headline de BASF Corporation de Research Triangle Park, NC, Estados Unidos

Tabla 14

Ejemplo	Bioactivo	Volumen añadido	Fungicida ^a	Volumen añadido	Turbidez (UNT)				
					T0	T1	T18	T24	T96
237	MI2	0,25	Q	1	552	554	544	670	1315
238	MI2	0,25	Q	2	896	894	868	891	1470
239	MI2	0,5	Q	1	588	578	564	564	608
240	MI2	0,25	F	1	578	599	568	568	1320
241	MI2	0,25	F	2	900	900	886	886	1330
242	MI2	0,25	H	1	436	433	454	454	1312
243	MI2	0,25	H	2	611	637	667	632	1302
244	MI7	0,25	Q	1	558	574	640	668	1273
245	MI7	0,25	F	1	517	560	990	1197	1396
246	MI7	0,25	H	1	465	476	605	587	1290
247	Control		-		93	101	901	986	1075
248	MI2	0,5			499	440	390	390	373
249	MI2	0,25			182	179	175	176	1122
250	MI2	0,5			262	260	260	275	275

a) Q - Fungicida Quadris de Syngenta Crop Protections, Inc. de Greensboro, NC, Estados Unidos
F - Fungicida Flint de Bayer CropScience LP de Research Triangle Park, NC, Estados Unidos y
H - Headline de BASF Corporation de Research Triangle Park, NC, Estados Unidos

Tabla 14A

Ejemplo	Bioactivo	Volumen añadido	Fungicida ^a	Volumen añadido	Cambio en turbidez (delta UNT)		
					T18-T1	T24-T1	T96-T1
237	MI2	0,25	Q	1	-10	116	761
238	MI2	0,25	Q	2	-26	-3	576
239	MI2	0,5	Q	1	-14	-14	30
240	MI2	0,25	F	1	-31	-31	721
241	MI2	0,25	F	2	-14	-14	430
242	MI2	0,25	H	1	21	21	879
243	MI2	0,25	H	2	30	-5	665
244	MI7	0,25	Q	1	66	94	699
245	MI7	0,25	F	1	430	637	836
246	MI7	0,25	H	1	129	111	814
247	Control		-		800	885	974
248	MI2	0,5			-50	-50	-67
249	MI2	0,25			-4	-3	943
250	MI2	0,5			0	15	15

a) Q - Fungicida Quadris de Syngenta Crop Protections, Inc. de Greensboro, NC, Estados Unidos

F - Fungicida Flint de Bayer CropScience LP de Research Triangle Park, NC, Estados Unidos y

H - Headline de BASF Corporation de Research Triangle Park, NC, Estados Unidos

fueron las mismas que se han usado en el conjunto de ejemplos anterior. Las formulaciones específicas ensayadas y los resultados obtenidos con ellas se presentan en las Tablas 14 y 14A.

5 Como se ve en las Tablas 14 y 14A, la combinación de las composiciones bioactivas de la presente invención con los productos de estrobilurina produjo una sinergia por lo que incluso los niveles más bajos de los productos de estrobilurina ensayados produjeron una inhibición significativa del crecimiento de levadura, incluso aunque estos productos parecen aumentar el crecimiento de levadura cuando se usan solos, como se muestra en las Tablas 13 y 13A.

Ejemplos 251-259 – Estudio de cobre/cinc

10 Se realizó una serie de experimentos para demostrar la bioeficacia de sistemas de metales binarios en comparación con el sistema ternario usado en la mayoría de los otros ejemplos. Aquí se comparó una solución de MI2 con una composición similar que contenía 300 ppm de cobre y 300 ppm de cinc (es decir, una solución de ácido cítrico acuosa al 16 % que tenía disueltos en la misma citrato de cobre, citrato de cinc, añadiéndose cada uno en una cantidad para proporcionar 300 ppm de cada metal, junto con el 0,25 % de lauroil sarcosinato sódico y el 0,32 de % de lauril sulfato sódico). Las dos composiciones bioactivas se evaluaron a diferentes cargas para evaluar su bioeficacia. Las formulaciones específicas ensayadas y los resultados obtenidos con ellas se presentan en las Tablas 15 y 15A.

20 Como se ve en las Tablas 15 y 15A, las composiciones bioactivas antimicrobianas tanto binarias (cobre/cinc – Cu/Zn) como la ternaria MI2 plata/cobre/cinc demostraron bioeficacia comparable en la inhibición del crecimiento de levadura.

Tabla 15

Ejemplo	Composición (gm)		T0	T1	T18	T24	T46
	Cu/Zn	MI2					
251	1		776	586	468	463	436
252	0,5		292	269	250	250	245
253	0,2		147	162	772	1055	1075
254	0,1		93	125	1076	1070	1036
255	Control		66	127	1020	1012	1137
256		1	830	633	547	522	500
257		0,5	335	320	292	302	284
258		0,2	152	178	512	1064	1098
259		0,1	90	136	1083	1087	1067

Tabla 15A

	Composición (gm)					
	Cu/Zn	MI2	T1-T0	T18-T0	T24-T0	T46-T0
251	1		-190	-118	-5	-27
252	0,5		-23	-19	0	-5
253	0,2		15	610	283	20
254	0,1		32	951	-6	-34
255	Control		61	893	-8	125
256		1	197	-86	-25	-22
257		0,5	-15	-28	10	-18
258		0,2	26	334	552	34
259		0,1	46	947	4	-20

Ejemplo 260-269 – Sinergia de Mancozeb

5 Se realizó una serie adicional de experimentos para evaluar la bioeficacia, especialmente la sinergia, de la composición agroquímica bioactiva que contiene Mancozeb (un etilen bisditiocarbamato) y la solución ácida bioactiva MI2 (MI2). Las formulaciones específicas ensayadas y los resultados obtenidos con las mismas se presentan en las Tablas 16 y 16A.

10 Como se ve en las Tablas 16 y 16A el mancozeb por sí mismo fue ineficaz a todos los niveles ensayados. La solución de ácido bioactivo por sí misma proporcionó una bioeficacia modesta, a pesar del nivel muy bajo de iones metálicos antimicrobianos; sin embargo, la bioeficacia adecuada parecía perderse después de 44 horas. En marcado contraste, la combinación de los dos, todos los niveles del mancozeb, demostró excelente bioeficacia, incluso después de 44 horas.

Tabla 16

Ejemplo	Composición (gm)						
	Mancozeb	MI2	T0	T1	T18	T24	T46
260	0,5		934	976	1220	1095	1091
261	0,4		780	859	1021	982	1052
262	0,3		624	717	1209	1067	1113
263	0,2		392	489	1035	933	1073
264		0,2	57	55	54	72	756
265	0,5	0,2	930	897	864	839	788
266	0,4	0,2	727	709	684	664	591
267	0,3	0,2	537	555	535	509	460
268	0,2	0,2	370	369	370	343	331
269	Control		23	106	935	824	917

15

Tabla 16A

Ejemplo	Composición (gm)					
	Mancozeb	MI2	T2-T0	T18-T0	T24-T0	T44-T0
260	0,5		42	286	161	157
261	0,4		79	241	202	272
262	0,3		93	585	443	489
263	0,2		97	643	541	681
264		0,2	-2	-3	15	699
265	0,5	0,2	-33	-66	-91	-142
266	0,4	0,2	-18	-43	-63	-136
267	0,3	0,2	18	-2	-28	-77

268	0,2	0,2	-1	0	-27	-39
269	Control		83	912	801	894

Ejemplos 270 - 293 – Estudio de tensioactivo de óxido de amina

5 Se realizó una serie de experimentos para demostrar la bioeficacia de los tensioactivos de óxido de amina, específicamente, óxido de lauril dimetil amina (LDAO), solo y en combinación con lauroil sarcosinato sódico (NaLS) y/o lauril sulfato sódico (SLS). En este caso se empleó una solución ácida de metal antimicrobiano muy diluida: ácido cítrico al 0,08 % y 1 ppm de cada uno de plata, cobre y cinc. Los tensioactivos se emplearon a diferentes niveles para evaluar la concentración más baja a la que se producía sinergia. Las formulaciones específicas ensayadas y los resultados obtenidos con las mismas se presentan en la Tabla 17.

10 Como se ve en la Tabla 17, incluso a una concentración tan baja de ácido y metal, la adición de tensioactivo óxido de lauril dimetil amina a solamente el 0,0025 % mostró bioeficacia, con bioeficacia modesta al nivel del 0,00125 % con lauroil sarcosinato sódico o a la combinación de lauroil sarcosinato sódico y/o lauril sulfato sódico. Al 0,0025 % de óxido de lauril dimetil amina se encontró una bioeficacia notable con adición de lauroil sarcosinato sódico y se encontró una eficacia superior con la adición tanto de lauroil sarcosinato sódico como de lauril sulfato sódico.

Estudio antibacteriano – Ejemplos 294-325

15 Se realizó una serie de experimentos para evaluar el rendimiento de los componentes individuales de las composiciones bioactivas reivindicadas así como diversas combinaciones de las mismas,

Tabla 17

Ejemplo	LDAO (p/p)	%	NaLS (p/p)	%	SLS (p/p)	%	AG, ppm	Cu,	Zn	T cero	T 1	T42	T66	T42-T1	T66-T1
270	0,00025									132	219	1145	1133	926	914
271	0,00125									141	211	1120	1039	909	828
272	0,0025									161	196	862	814	666	618
273	0,00025							1		142	209	1108	1138	899	929
274	0,00125							1		144	208	1080	1076	872	868
275	0,0025							1		156	208	963	969	755	791
276										144	239	1232	1216	993	977
277	0,00025		0,00025							144	217	1084	1042	867	825
278	0,00125		0,00125							136	169	860	784	691	615
279	0,0025		0,0025							136	136	562	543	426	407
280	0,00025		0,00025					1		150	216	1032	1021	816	805
281	0,00125		0,00125					1		165	186	872	852	686	666
282	0,0025		0,0025					1		174	184	181	295	-3	111
283			0,00025							149	248	1138	1165	890	917
284			0,00125							142	202	1019	1018	817	816
285			0,0025							147	207	1034	1007	827	800
286								1		153	242	1167	1178	925	936
287										165	270	1223	1207	953	937
288	0,00025		0,00025		0,00025					178	272	1094	1006	822	734
289	0,00125		0,00125		0,00125					167	242	800	686	558	444
290	0,0025		0,0025		0,0025					224	212	605	550	393	338
291	0,00025		0,00025		0,00025			1		171	252	1039	1010	787	758
292	0,00125		0,00125		0,00125			1		260	258	862	872	604	614
293	0,0025		0,0025		0,0025			1		264	257	242	242	-15	-15

20 incluyendo las composiciones reivindicadas en sí mismas, en la supresión del crecimiento de diversas bacterias. Se seleccionaron *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) como organismos de ensayo ya que se aceptan generalmente en la industria como organismos indicadores de una amplia diversidad de bacterias. Se evaluaron dos metodologías de ensayo diferentes, una que ensayaba la eficacia en un medio de caldo de cultivo y la otra que ensayaba la inhibición en medio de cultivo en placas.

Ejemplos 294-305

En el primer conjunto de experimentos se preparó un medio de cultivo añadiendo 10 g de medio nutriente (caldo de

dextrosa Difco-Sabouraud de BD de Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos) a 300 ml de agua destilada. Las alícuotas de 20 ml del medio de cultivo se distribuyeron en frascos de vidrio de borosilicato de 40 ml estériles con tapones revestidos de Teflón (VWR International Cat. N° 15900-004). Los frascos se inocularon con las bacterias usando un asa estéril y los frascos se incubaron después a 37 °C. Se añadió después una composición bioactiva de acuerdo con la invención a ciertos frascos, la composición bioactiva fue (MI2), como se ha descrito anteriormente, que comprendía una solución de ácido cítrico acuosa al 16 % que tenía disueltos en la misma citrato de plata, citrato de cobre, citrato de cinc, cada uno añadido en una cantidad para proporcionar 200 ppm de cada metal, junto con el 0,25 % de lauroil sarcosinato sódico y el 0,32 % lauril sulfato sódico. Después se determinó la turbidez de cada mezcla y el frasco se transfirió a un incubador a 30 °C. Se realizaron mediciones de turbidez como en los estudios de levadura anteriormente citados. Cada frasco se retiró periódicamente del incubador y la mezcla en los frascos se evaluó con respecto a turbidez. Las formulaciones específicas ensayadas, el momento de cada evaluación de turbidez y los resultados obtenidos por la misma fueron como se expone en la Tabla 18.

Como con el estudio de levadura, la concentración de los metales se refiere a la cantidad aproximada de cada metal, cobre, plata y cinc. Las concentraciones no representan el volumen de MI2 añadido: por lo tanto, las concentraciones presentadas están basadas en un volumen total de 20 ml.

Como se ve en la Tabla 18, hubo aumento a corto plazo de la turbidez. Puesto que no se anticipaba que se manifestara ningún crecimiento significativo en un periodo de tiempo tan corto, se cree que el aumento inicial de la turbidez resultó de una desnaturalización de las proteínas en el caldo de cultivo y/o proteínas bacterianas. Independientemente, los resultados a mayor plazo muestran excelente inhibición bacteriana con las composiciones de acuerdo con la presente invención.

Ejemplo	Bacteria	MI2 (ml)	Tabla 18		Tiempo (horas)				
			Metales ppm	T0	T 0,5	T 18	T 24	T 96	
294	<i>E. coli</i>	0	0	15,3	16	119	136	264	
295		0,5	5	131	135,3	165	162	162	
296		1	10	445	454	481	480	480	
297		2	20	1039	1080	1135	1140	1009	
298	<i>P. aeruginosa</i>	0	0	35,8	37,8	158	383	436	
299		0,5	5	197	207	250	262	261	
300		1	10	705	735	782	808	807	
301		2	20	1011	1057	1121	1159	1146	
302	<i>S. aureus</i>	0	0	46	45	148	184	406	
303		0,5	5	215	163	173	183	184	
304		1	10	643	494	326	309	276	
305		2	20	1203	1032	595	525	281	

Ejemplo 306

En este experimento, se situaron seis cubreobjetos estériles de 25 mm en placas de petri estériles de 100 x 15 mm separadas y se inocularon dos de cada uno con 100 µl de uno de tres caldos TSB, conteniendo cada caldo uno de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* que se había permitido que se incubaran durante 48-54 horas. Para fijar el inóculo a los cubreobjetos, las placas de petri se situaron en una placa térmica a baja temperatura durante aproximadamente 5 minutos. Se separó una de cada una de las placas de petri inoculadas como controles positivos. La otra se pulverizó con cuatro pulverizaciones de una dilución 4:1 de las composiciones bioactivas MI2. Después de 2-3 minutos los cubreobjetos y los contenidos líquidos de cada placa de petri se transfirieron de forma aséptica a frascos separados que contenían 20 ml de TSB y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Se prepararon controles negativos situando cubreobjetos estériles no inoculados en los 20 ml de TSB e incubando también. Después de 24 horas, no se observó crecimiento con los controles negativos o con los cubreobjetos inoculados que se habían pulverizado con la composición bioactiva de la presente invención. Se observó crecimiento visual en dos de los controles positivos (es decir, los frascos que contenían los cubreobjetos inoculados que no se habían pulverizado): el control positivo para *P. aeruginosa* no mostró crecimiento visual. Se cree que la falta de crecimiento mostrada por este último resultó de sobrecalentar el inóculo durante la etapa de fijación.

Ejemplo 307

En este experimento, se inocularon dos placas de agar de soja Trypticase (TSA) con 500 µl de uno de tres caldos TSB para un total de 6 placas inoculadas: cada caldo contenía uno de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* que se había permitido que se incubaran durante 48-54 horas. El inóculo se propagó por la superficie de la placa con un asa estéril. Se situó un disco de papel de filtro de 15 mm de diámetro que se había sumergido en una dilución 4:1 de la composición bioactiva MI2 en el centro de una de cada conjunto de placas inoculadas y todas las placas se situaron en un incubador a 37 °C durante 24 horas. Las placas de control no inoculadas también se situaron en el incubador.

Después de 24 horas, se observó crecimiento visual. No se vio crecimiento bacteriano en las placas no inoculadas. Se observó crecimiento en todas las placas inoculadas; sin embargo, en las placas en las que se había colocado el papel de filtro tratado, no se vio crecimiento en o cerca del papel de filtro. Cada disco de papel de filtro tratado manifestó una clara zona de inhibición del crecimiento bacteriano.

5 **Ejemplo 308**

En este experimento, se inocularon dos placas de agar de soja Trypticase (TSA) con 500 µl de uno de tres caldos TSB para un total de 6 placas inoculadas: cada caldo contenía uno de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* que se había permitido que incubaran durante 48-54 horas. El inóculo se propagó uniformemente por la superficie de la placa con un asa estéril. Después se pulverizó una de cada placa inoculada, aproximadamente 24 veces, con la dilución 4:1 de la composición bioactiva MI2. Las placas inoculadas más un conjunto de placas de control no inoculadas se situaron en un incubador a 37 °C durante 24 horas.

Después de 24 horas, se observó crecimiento visual en placas inoculadas pero no tratadas mientras que no se vio crecimiento bacteriano en las placas no inoculadas o en las placas inoculadas que se habían pulverizado con la composición bioactiva diluida.

15 **Ejemplo 309 – Estudio de CMI bacteriana**

Se realizó un estudio para determinar la concentración mínima inhibidora (CMI) de la solución ácida de MI2, es decir, 200 ppm de cada uno de metales de plata, cobre y cinc (véase Ejemplos 72-79). Se evaluaron tres bacterias diferentes, *Clavibacter michianese*, *Pseudomonas syringae* y *Erwinia amylovora*, cada una en un medio de cultivo apropiado para esa bacteria, concretamente caldo/agar de infusión cerebral, caldo/agar nutriente y caldo/agar nutriente de glucosa, respectivamente. Al realizar el ensayo, se prepararon tres conjuntos de 10 tubos de ensayo, un conjunto para cada bacteria, y se etiquetaron de 1 a 10. Se pusieron 0,5 ml del caldo apropiado en cada uno de los tubos de ensayo 2 a 10. Después se añadieron 0,5 ml de la solución MI2 a cada uno de los tubos de ensayo 1 y 2. Después se transfirieron 0,5 ml de los contenidos del tubo de ensayo 2 al tubo de ensayo 3 y después 0,5 ml del tubo de ensayo 3 al tubo de ensayo 4 y así sucesivamente hasta el tubo de ensayo 9. Se descartaron 0,5 ml del tubo de ensayo 9. Se añadió después una suspensión de 0,5 ml de cada bacteria para ensayar a cada uno de los 10 tubos para esa serie y los tubos se incubaron durante 24 horas a 26 °C. Debido a que la solución ácida provocó turbidez considerable de los tubos a los que se añadió, no fue posible la evaluación macroscópica. En su lugar, cada tubo se subcultivó en placas de agar correspondientes. El crecimiento observado fue como se indica en la Tabla 19 (un “+” indica crecimiento visual y un “-” ausencia de crecimiento).

30 Tabla 19

Tubo de ensayo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentración de metales* (ppm)	200	50	25	12,5	6,75	3,125	1,56	0,782	0,391	0,195
<i>C. michiganese</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>P. syringae</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>E. amylovora</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

* - concentración de cada metal, el contenido de metal total es 3 veces el número presentado.

Basándose en los resultados presentados en la Tabla 19, la CMI de MI2 es 3,125 ppm para *C. michiganese* y *E. amylovora* y 6,75 ppm para *P. syringae*. Se anticipa que la bioeficacia de tales niveles bajos muestra sinergia cuando se combinan con fungicidas/bactericidas convencionales para estos organismos diana.

Ejemplo 326 – Protector después de la cosecha

Para evaluar la viabilidad de las composiciones bioactivas de la presente invención como una composición protectora de productos alimentarios antes de la cosecha/después de la cosecha, se preparó una composición bioactiva de acuerdo con la presente invención que comprendía 5 ppm de plata, 5 ppm de cobre y 5 ppm de cinc (todas como especies iónicas), el 0,05 % de lauroil sarcosinato sódico y el 0,05 % de lauril sulfato sódico en el 0,4 % de ácido cítrico. La composición se aplicó por pulverización a un melocotón maduro. Se trató un segundo melocotón maduro con una solución de mancozeb y se dejó sin tratar un tercer melocotón maduro. Se permitió que los tres melocotones se mantuvieran en un ambiente húmedo durante varias semanas. Después de varias semanas, se encontró que el melocotón no tratado tenía podredumbre marrón cubriendo la mayoría de la superficie. El melocotón tratado con mancozeb manifestaba tanto podredumbre marrón como crecimiento de moho en la mayoría de superficie. Por otro lado, el melocotón tratado con la composición bioactiva de la presente invención no mostró señales externas de podredumbre o descomposición. Su color aún era vivo y su textura blanda pero firme. Tales resultados demuestran el enorme potencial de estos materiales bioactivos como tratamientos antes de la cosecha y después de la cosecha para productos alimentarios para protección contra bacterias patógenas, indicadoras y/o de deterioro.

Ejemplo 327 – Mancha foliar por *Alternaria*

Para demostrar la eficacia de las composiciones bioactivas en plantas vivas, se realizó un estudio comparativo que comparaba la eficacia de una composición bioactiva de acuerdo con la presente invención con dos productos comerciales, Eagle 40 WP, un fungicida a base de miclobutanilo (40 % en peso) disponible de Dow AgroSciences LLC de Indianapolis, IN, Estados Unidos y Scala SC, un fungicida a base de pirimetanilo (54,6 %) en peso disponible de Bayer CropScience LP de Research Triangle Park, NC, Estados Unidos. Se realizaron evaluaciones adicionales para determinar el potencial de sinergia entre las composiciones bioactivas de la invención y Eagle 40WP. La composición bioactiva de acuerdo con la presente invención comprendía una solución de ácido cítrico acuosa al 16 % que tenía disueltos en la misma hidrato de plata, citrato de cobre y citrato de cinc en una cantidad para proporcionar 200 ppm de cada metal en la solución, el 0,25 % de lauroil sarcosinato sódico y el 0,32 % de lauril sulfato sódico (MI6). Esta solución se diluyó a tasas de 40:1 y 20:1 para su aplicación a las plantas proporcionando de este modo una solución que contenía ~ 5 ppm y ~ 10 ppm de cada metal al pulverizar.

Se plantaron esquejes con raíces de *Pittosporum tobira* "Wheeleri" en macetas convencionales de 10 cm que contenían mezcla Sunshine N° 1 y se fertilizaron con media cucharada de Osmocote Plus 15-9-12. Las plantas se situaron en un invernadero caliente con polietileno y un toldo que cubre la parte superior y los laterales y con irrigación por inundación según se necesite. Después de 44 días, las plantas se trataron con los diversos tratamientos antifúngicos, se trataron 12 plantas con cada tratamiento. A continuación, las plantas se situaron en bolsas de plástico transparentes individuales (alta humedad) en el invernadero durante el transcurso del estudio. Las plantas se irrigaron desde abajo usando un banco de reflujo e inundación para asegurar que no había aplicación de agua a sus hojas durante el ensayo. Las plantas se inocularon posteriormente pulverizando con una suspensión de esporas de un cultivo de *Alternaria pittospori* mezclado con agua esterilizada 4 días después del tratamiento inicial. Los tratamientos se volvieron a aplicar 7 días y 17 días después de la inoculación. Todos los tratamientos se aplicaron mediante pulverización hasta que las superficies de las hojas de la planta estaban completamente humectadas (comenzaron a gotear). Se usaron dos conjuntos de plantas como controles positivos y negativos: el primer conjunto se trató solamente con agua (tratamiento A) y no se inoculó. El segundo conjunto también se trató solamente con agua, pero se inoculó simultáneamente con los otros. Las formulaciones específicas para cada uno de los tratamientos fueron como se expone en la Tabla 20.

Tabla 20

Tratamiento	Composición	Dilución
A	Agua- sin inoculación	
B	Agua - inoculación	
C	MI6	6,25 ml/250 ml agua
D	MI6	12,5 ml/250 ml agua
E	MI6/Eagle40WP	6,25 ml/250 ml agua//42,5 g/378,5 litros (1,5 oz/100 gal) agua
F	MI6/Eagle40WP	6,25/250 ml agua//85 g/378,5 litros (3,0 oz/100 gal) agua
G	MI6/Eagle40WP	12,5 ml/250 ml agua//42,5 g/378,5 litros (1,5 oz/100 gal) agua
H	Eagle 40 WP	42,5* g/378,5 litros (1,5 oz/100 gal) agua
I	Eagle 40WP	85 g/378,5 litros (3,0 oz/100 gal) agua
J	Scala	255* g/378,5 litros (9 oz/100 gal) agua
* tasas de aplicación recomendadas por el fabricante		

Seis después del segundo tratamiento, las plantas se evaluaron con respecto a manchas foliares por *Alternaria* de inspección visual. Los resultados de elaboración de manchas foliares fueron como se presentan en la Tabla 21. Como se ve en la Tabla 21, las plantas tratadas con la concentración más baja de la composición bioactiva (con 5 ppm de cada ión metálico, Tratamiento C) aún mostraban un descenso de casi el 50 % en la formación de manchas foliares. La duplicación de la composición bioactiva (~ 10 ppm de cada ión metálico, Tratamiento D) redujo las manchas foliares en más del 75 %. Se descubrieron resultados algo similares con las dos diluciones del fungicida comercial Eagle 40WP reduciendo la concentración más baja (Tratamiento H) las manchas foliares en aproximadamente el 30 % mientras que la concentración más alta (Tratamiento I) redujo las manchas foliares en el 80 %. La combinación de los dos proporcionó una mejora notable, proporcionando, extrañamente, la combinación de las dos concentraciones más bajas inhibición casi completa de la manifestación de manchas foliares. El otro fungicida comercial Scala SC no proporcionó inhibición y pareció promover la manifestación de manchas foliares.

40

Tabla 21

Tratamiento	Nº de Planta												Media
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
B.	4	5	0	15	35	20	40	15	10	25	30	20	18,2
C.	0	0	0	0	0	5	35	35	40	0	0	0	9,6
D.	0	1	0	0	5	0	0	0	0	5	10	30	4,2
E.	0	0	0	0	0	1	0	0	5	0	0	0	0,5
F.	0	0	0	0	0	0	25	0	0	5	10	0	3,3
G.	0	0	0	0	0	0	0	15	10	0	0	0	2,1
H.	0	0	0	5	10	0	30	35	40	10	10	15	12,9
I.	2	0	0	0	0	0	10	25	5	0	0	0	3,5
J.	25	25	10	5	15	25	30	0	40	40	40	20	22,9

Once días después del último tratamiento, se evaluó de nuevo la gravedad de la enfermedad. Sin embargo, debido al número de manchas que hizo dar una evaluación numérica imposible, se registró la gravedad de la enfermedad usando la siguiente escala: 1 – 1 – sin enfermedad, 2 – ligera, 3 – moderada, 4 – grave a 5 – planta muerta. Los resultados se presentan en la Tabla 22.

5

Tabla 22

Tratamiento	Nº de Planta												Media
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A.	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,1 a
B.	2,5	2,5	1	4	3,5	3	4	2	2	3	3	3,5	2,8 c
C.	1	1	1	1	1	2	2	2,5	2,5	2	2	1	1,6 a
D.	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	2	2,5	1,4 a
E.	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	2	1,2 a
F.	1	2	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1,3 a
G.	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1,2 a
H.	2	2	1	2,5	2	2	2,5	3	3	2	2,5	2,5	2,2 b
I.	2,5	1	1	1	2	2	2	2	1	2	2	2	1,7 a
J.	3,5	4	3	3	3	4	3,5	2,5	4	4	4	4	3,5 d

Como se muestra en la Tabla 22, las composiciones bioactivas de acuerdo con la presente invención proporcionaron excelente protección contra manchas foliares, mostrando las plantas tratadas al nivel mayor y en combinación con el fungicida comercial Eagle 40WP casi el mismo nivel de enfermedad que las que no se habían inoculado en absoluto. Por el contrario, el Eagle por sí solo, incluso a la tasa de aplicación recomendada, demostró menos eficacia que la composición bioactiva. Finalmente, el Scala de nuevo no mostró ninguna eficacia y, de hecho, resultó ser más perjudicial. Se sospechó que las plantas tratadas con Scala manifestaron tanto enfermedad de manchas foliares como fitotoxicidad. Ninguna de las plantas tratadas con la composición bioactiva del fungicida comercial Eagle mostró pruebas de citotoxicidad.

10

15

Aunque la presente invención se ha descrito con respecto a las realizaciones y ejemplos específicos anteriores, debería apreciarse que son posibles otras realizaciones que utilizan el concepto de la presente invención sin alejarse del alcance de la invención. La presente invención se define por los elementos reivindicados y todas y cada una de las modificaciones, variaciones o equivalentes que quedan dentro del alcance de los principios subyacentes.

REIVINDICACIONES

1. Un composición bioactiva protectora para conservar alimentos o para retardar la aparición de deterioro en los alimentos que comprende a) del 0,01 al 10 % en peso de un ácido, b) al menos una fuente de ión metálico antimicrobiano, c) un diluyente o un vehículo, d) opcionalmente, del 0,001 al 3 % en peso de al menos un tensioactivo aniónico, no iónico y/o anfotérico que afecte a o interaccione con membranas de la pared celular de microorganismos o con el funcionamiento de las mismas, siempre que cuando el ácido sea distinto de un ácido mineral el tensioactivo (d) esté presente, en la que el ácido está presente en un exceso molar de al menos dos veces en relación con los iones metálicos antimicrobianos y la concentración de los iones metálicos antimicrobianos es de 1 ppm a 500 ppm en el caso de un ión metálico único y de 2 ppm a 1000 ppm en el caso de múltiples iones metálicos y en la que la composición tiene un pH de menos de 6; siendo todos los componentes de la composición seguros, a los niveles aplicados, para consumo humano.
2. La composición bioactiva protectora de la reivindicación 1 en la que i) el ácido y el diluyente están en forma de una solución de ácido carboxílico de base acuosa que tiene un pH de menos de 6 y una concentración de ácido del 0,01 al 10 % en peso; ii) los iones metálicos antimicrobianos se seleccionan del grupo que consiste en iones de plata, iones de cobre, iones de cinc, una combinación de iones de plata y cobre, una combinación de iones de plata y cinc, una combinación de iones de cobre y cinc y una combinación de iones de plata, cobre y cinc; y iii) el al menos un tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en sulfonatos, sulfatos, sulfosuccinatos, sarcosinatos, óxidos de amina y combinaciones de los mismos: siendo todos los componentes de la composición seguros, a los niveles aplicados, para consumo humano.
3. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 en la que el pH es de 1,5 a 5.
4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 en la que el pH es de 2 a 4.
5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en la que el exceso molar de ácido en relación con iones metálicos antimicrobianos es un exceso molar de al menos 5 veces.
6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la que los iones metálicos antimicrobianos están presentes a un nivel de 2 ppm a 100 ppm si solamente hay un ión metálico o de 5 ppm a 200 ppm si hay múltiples iones metálicos.
7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la que los iones metálicos antimicrobianos están presentes a un nivel de 5 ppm a 50 ppm si solamente hay un ión metálico o de 5 ppm a 150 ppm si hay múltiples iones metálicos.
8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en la que la concentración del ácido es del 0,1 al 4 % en peso.
9. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en la que el tensioactivo se selecciona de cocamidopropil betaina, N-cocoil sarcosinato sódico, alquil poliglicósido, dilauril sulfosuccinato, lauroil sarcosinato sódico, lauril sulfato sódico, óxido de lauril dimetil amina, una combinación de lauroil sarcosinato sódico y lauril sulfato sódico, una combinación de lauril sulfato sódico y óxido de lauril dimetil amina, una combinación de lauroil sarcosinato sódico y óxido de lauril dimetil amina o una combinación de lauroil sarcosinato sódico, lauril sulfato sódico y óxido de lauril dimetil amina.
10. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 que comprende además un material aglutinante consumible seleccionado de una cera, una resina natural o sintética formadora de película soluble, una resina polimerizable formadora de película, goma arábica, un látex o un fosfolípido natural.
11. Un material de envasado o de empaquetamiento de alimentos que se ha tratado con una composición bioactiva protectora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
12. El material de envasado o de empaquetamiento de la reivindicación 11 que comprende un material a base de celulosa que se ha revestido con, sumergido en o saturado con la composición bioactiva protectora.
13. El material de envasado o de empaquetamiento de la reivindicación 11 que comprende un material polimérico sintético que se ha revestido con la composición bioactiva protectora.
14. El material de envasado o de empaquetamiento de la reivindicación 11 en el que la composición bioactiva protectora se ha incorporado en el material de envasado o de empaquetamiento que está compuesto de un material polimérico sintético o de hielo.
15. Un procedimiento para conservar alimentos y/o retardar la aparición de deterioro en los alimentos comprendiendo dicho procedimiento a) situar los alimentos en un material de envasado o de empaquetamiento que se ha tratado con una composición bioactiva protectora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o b) aplicar una composición bioactiva protectora de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, a la superficie del alimento antes de la cosecha, después de la cosecha o después del procesamiento pero antes del

empaquetamiento.