

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 638**

51 Int. Cl.:

A61L 2/16 (2006.01)
A61L 101/32 (2006.01)
A23L 3/3463 (2006.01)
A01N 35/02 (2006.01)
C02F 1/50 (2006.01)
A01N 37/02 (2006.01)
A23K 20/105 (2006.01)
A23K 20/158 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2012 PCT/US2012/059169**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2013 WO2013059012**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2012 E 12842371 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2768539**

54 Título: **Formulaciones antimicrobianas con ácido perlargónico**

30 Prioridad:

20.10.2011 US 201161549661 P

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

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**PIMENTEL, JULIO y
RICHARDSON, KURT**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 618 638 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

Formulaciones antimicrobianas con ácido perlargónico.

Solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud provisional de EE.UU. 61/549.661, presentada el 20 de octubre de 2011, incorporada en la presente por referencia.

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

Una formulación antifúngica que consiste en una mezcla de ácidos orgánicos y aldehídos donde dicha combinación producía respuesta sinérgica comparado con la adición de niveles altos de los otros componentes.

10 Antecedentes

Los centros para el control y la prevención de enfermedades (CDC) calculan que aproximadamente uno de cada seis americanos o 48 millones de personas caen enfermas por enfermedades de transmisión alimentaria cada año. Otros 128.000 son hospitalizados y mueren aproximadamente 3.000 de enfermedad de transmisión alimentaria cada año. En un informe de 2011 los CDC calcularon que 20.000 casos de *Salmonella* llevaron a hospitalización, y que 15 378 de esos casos llevaron a la muerte. También se ha calculado que *E. coli* O157:H7 causa aproximadamente 62.000 casos de enfermedades de transmisión alimentaria y aproximadamente 1.800 hospitalizaciones relacionadas con enfermedades de transmisión alimentaria en Estados Unidos.

Un estudio de la Pew Charitable Trusts de la Universidad de Georgetown sugería que las enfermedades de transmisión alimentaria cuestan a los Estados Unidos 152 mil millones de dólares en gastos relacionados con la salud cada año. 20

A medida que el mundo avanza hacia antimicrobianos más naturales y/u orgánicos, la necesidad de encontrarlos ha dado como resultado una gran cantidad de investigación, así como mayor coste para las nuevas materias primas debido a la baja disponibilidad comercial de estos nuevos productos naturales/orgánicos.

25 El formaldehído se ha usado como un antiséptico durante muchos años. Dos patentes, US 5.547.987 y US 5.591.467, enseñan el uso del formaldehído para controlar *Salmonella* en piensos para animales. Estas patentes no sugieren que una combinación de formaldehído y un ácido orgánico proporcionaría un efecto sinérgico, como se describe en la presente invención.

30 Se han encontrado nuevos antimicrobianos en muchas plantas. Estos antimicrobianos protegen a las plantas de la infestación bacteriana, fúngica, vírica y de insectos. Estos antimicrobianos, que son componentes de los aceites esenciales de las plantas, pueden ser productos químicos ácidos, basados en alcohol o aldehído.

Uno de los compuestos volátiles usados en esta invención es el trans-2-hexenal, que es un aldehído de seis carbonos con un doble enlace conjugado, C₆H₁₀O y MW=98,14. Los aldehídos se representan por la fórmula general RCHO, donde R puede ser hidrógeno o un grupo aromático, alifático o heterocíclico. Son moderadamente solubles en agua y la solubilidad disminuye al aumentar el peso molecular. Los aldehídos alifáticos insaturados incluyen 35 propenal, trans-2-butenal, 2-metil-2-butenal, 2-metil-(E)-2-butenal, 2-pentenal, trans-2-hexenal, trans-2-hexen-1-ol, 2-metil-2-pentanal, 2-isopropilpropenal, 2-etil-2-butenal, 2-etil-2-hexenal, (Z)-3-hexenal, 3,7-dimetil-6-octenal, 3,7-dimetil-2,6-octadienal, (2E)-3,7-dimetil-2-6-octadienal, (2Z)-3,7-dimetil-2,6-octadienal, trans-2-nonenal, (2E,6Z)-nonadienal, 10-undecanal, 2-dodecenal, 2,4-hexadienal y otros.

40 El trans-2-hexenal está presente en muchas plantas comestibles tales como manzanas, peras, uvas, fresas, kiwi, tomates, olivas, etc. El uso de plantas y extractos de plantas ha tenido éxito en estudios que buscan nuevos antimicrobianos. Por ejemplo, el anacardo era eficaz contra *Helicobacter pylori* y *S. choleraesuis* (50-100 ug/ml). Se encontró que los dos componentes principales eran el ácido anacárdico y el trans-2-hexenal. La actividad inhibidora mínima y la actividad biocida mínima del trans-2-hexenal se determinó que eran 400 y 800 ug/ml, respectivamente (Kubo, J.; Lee, J. R.; Kubo, I. Anti-Helicobacter pylori Agents from the Cashew Apple. *J. Agric. Food Chem.* 1999, v. 47, 533-537; Kubo, I. y K. Fujita, Naturally Occurring Anti-Salmonella Agents. *J. Agric. Food Chem.* 2001, v. 49, 5750-5754). Kim y Shin encontraron que el trans-2-hexenal (247 mg/l) era eficaz contra *B. cereus*, *S. typhimurium*, *V. parahaemolyticus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli* O157:H7 (Kim, Y. S.; Shin, D. H. Volatile Constituents from the Leaves of Callicarpa japonica Thunb. and Their Antibacterial Activities. *J. Agric. Food Chem.* 2004, v. 52, 781-787). Nakamura y Hatanaka (Green-leaf-derived C6-roma compounds with potent antibacterial action that act 45 on both gram-negative and gram-positive bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 2002, v. 50 no, 26, 7639-7644) demostraron que el (3E)-hexenal era eficaz para controlar *Staphylococcus aureus*, *E. coli* y *Salmonella typhimurium* en un nivel de 3 - 30 ug/ml. El trans-2-hexenal inhibía completamente la proliferación tanto de patovares de *P. syringae* (570 µg/l de aire) como de *E. coli* (930 microgramos/l de aire) (Deng, W.; Hamilton-Kemp, T.; Nielsen, M.; Anderson, R.; Collins, G.; Hilderbrand, D. Effects of Six-Carbon Aldehydes and Alcohols on Bacterial Proliferation. *J. Agric. Food Chem.* 50

1993, v. 41, 506-510). Se observó que el trans-2-hexenal con 250 ug/ml era eficaz para inhibir el crecimiento de micelios Phoma (Saniewska, S. y M. Saniewski, 2007. The effect of trans-2-hexenal and trans-2-nonenal on the mycelium growth of Phoma narcissi in vitro, *Rocz. AR. Pozn. CCCLXXXIII*, Ogrodn. V. 41,189-193). En un estudio para controlar los mohos en frutos se encontró que el trans-2-hexenal no era fitotóxico para los albaricoques, pero era fitotóxico para melocotones y nectarinas con 40 µl/l (Neri, F., M. Mari, S. Brigati y P. Bertolini, 2007, Fungicidal activity of plant volatile compounds for controlling *Monolinia laxa* in stone fruit, *Plant Disease* v. 91, no.1, 30-35). El trans-2-hexenal (12,5 µl/l) era eficaz para controlar *Penicillium expansum* que causa el moho azul (Neri, F.; Mari, M.; Menniti, A.; Brigati, S.; Bertolini, P. Control of *Penicillium expansum* in pears and apples by trans-2-hexenal vapours. *Postharvest Biol. and Tech.* 2006, v. 41, 101-108. Neri, F.; Mari, M.; Menniti, A. M.; Brigati, S. Activity of trans-2-hexenal against *Penicillium expansum* in 'Conference' pears. *J. Appl. Microbiol.* 2006, v. 100, 1186-1193). Fallik, E. et al. (Trans-2-hexenal can stimulate *Botrytis cinerea* growth in vitro and on strawberries in vivo during storage, *J. ASHS.* 1998, v. 123, no. (5, 875-881) y Hamilton-Kemp, et. al, (*J. Agric. Food Chem.* 1991, v. 39, no. 5, 952-956) sugirieron que los vapores de trans-2-hexenal inhibían la germinación de esporas de *Botrytis* y polen de manzana.

La solicitud publicada de EE.UU. nº 2007/0087094 sugería el uso de al menos dos compuestos GRAS microbicidas activos con menos de 50% de alcohol (isopropanol o isopropanol/etanol) como un microbicida. El trans-2-hexenal se podría considerar uno de los compuestos GRAS (Schuer. Process for Improving the Durability of, and/or Stabilizing, Microbially Perishable Products. Solicitud publicada de EE.UU. Nº 2007/0087094). También, Archbold et al. observaron que el uso del 2-hexenal con 0,86 o 1,71 mmol (100 o 200 microlitros de compuesto solo por recipiente de 1,1 litros, respectivamente) durante 2 semanas como fumigación después de cosecha de las uvas de mesa sin semillas mostraba ser prometedor para el control del moho (Archbold, D.; Hamilton-Kemp, T.; Clements, A.; Collins, R. Fumigating 'Crimson Seedless' Table Grapes with (E)-2-Hexenal Reduces Mold during Long-term Postharvest Storage. *HortScience.* 1999, v. 34, no. (4, 705-707).

La patente de EE.UU. 5.698.599 sugiere un método para inhibir la producción de micotoxinas en un producto alimenticio tratándolo con trans-2-hexenal. El trans-2-hexenal inhibía completamente el crecimiento de *A. flavus*, *P. notatum*, *A. alternate*, *F. oxysporum*, especies *Cladosporium*, *B. subtilis* y *A. tumerfaciens* en una concentración de 8 ng/l de aire. Cuando se comparaba el trans-2-hexenal con el citral en el control de levaduras (10^5 UFC/botella) en bebidas, se encontró que 25 ppm de trans-2-hexenal y tratamiento térmico (56°C durante 20 min) era equivalente a 100 - 120 ppm de citral. En las bebidas que no se trataron térmicamente, eran necesarias 35 ppm de trans-2-hexenal para estabilizarlas (Belletti, N.; Kamdem, S.; Patrignani, F.; Lanciotti, R.; Covelli, A.; Gardini, F. Antimicrobial Activity of Aroma Compounds against *Saccharomyces cerevisiae* and Improvement of Microbiological Stability of Soft Drinks as Assessed by Logistic Regression. *AEM.* 2007, v. 73, no. 17, 5580-5586). El trans-2-hexenal no solo se ha usado como antimicrobiano, sino que también se ha observado que es eficaz en el control de insectos. Los compuestos volátiles (es decir, trans-2-hexenal) eran eficaces contra escarabajos tales como *Tibolium castaneum*, *Rhyzopertha dominica*, *Sitophilus granaries*, *Sitophilus oryzae* y *Cryptolestes ferrugineus* (Hubert, J.; Munzbergova, Z.; Santino, A. Plant volatile aldehydes as natural insecticides against stored-product beetles. *Pest Manag. Sci.* 2008, v. 64, 57-64). La patente de EE.UU. 6.201.026 (Hammond et al. Volatile Aldehydes as Pest Control Agents) sugiere un aldehído orgánico de 3 o más carbonos para el control de pulgones.

Varias patentes sugieren el uso del trans-2-hexenal como una fragancia o perfume. La patente de EE.UU. 6.596.681 sugiere el uso de trans-2-hexenal como una fragancia en un paño para limpiar superficies. La patente de EE.UU. 6.387.866, patente de EE.UU. 6.960.350 y patente de EE.UU. 7.638.114 sugieren el uso de aceite esencial o terpenos (por ejemplo, trans-2-hexenal) como perfume para productos antimicrobianos. La patente de EE.UU. 6.479.044 demuestra una solución antimicrobiana que comprende un tensioactivo aniónico, un antibacteriano policatiónico y agua, donde se añade un aceite esencial como perfume. Este perfume podría ser un terpeno tal como el trans-2-hexenal u otro tipo de terpenos. La patente de EE.UU. 6.323.171, patente de EE.UU. 6.121.224 y patente de EE.UU. 5.911.915 demuestran una microemulsión con fin antimicrobiano que contiene un tensioactivo catiónico donde se añade un aceite esencial como perfume. Este perfume puede contener diferentes terpenos que incluyen el trans-2-hexenal. La patente de EE.UU. 6.960.350 demuestra una fragancia antifúngica donde se encontró un efecto sinérgico cuando se usaron diferentes terpenos en combinaciones (por ejemplo, trans-2-hexenal con benzaldehído).

El modo de acción del trans-2-hexenal se cree que es la alteración de la membrana celular debido a una reacción del aldehído insaturado con restos sulfhidrilo o cisteína, o la formación de bases de Schiff con grupos amino en péptidos y proteínas (Deng, W.; Hamilton-Kemp, T.; Nielsen, M.; Anderson, R.; Collins, G.; Hilderbrand, D. Effects of Six-Carbon Aldehydes and Alcohols on Bacterial Proliferation. *J. Agric. Food Chem.* 1993, v.41, 506-510). Se describe que el trans-2-hexenal actúa como un tensioactivo, pero posiblemente permea por difusión pasiva a través de la membrana plasmática. Una vez dentro de las células, su resto aldehído α,β -insaturado reacciona con grupos nucleófilos biológicamente importantes. Este resto aldehído se sabe que reacciona con grupos sulfhidrilo principalmente por adición 1,4 en condiciones fisiológicas (Patrignani, F.; Lucci, L.; Belletti, N.; Gardini, F.; Guerzoni, M. E.; Lanciotti, R. Effects of sub-lethal concentrations of hexanal and 2-(E)-hexenal on membrane fatty acid composition and volatile compounds of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli*. *International J. Food Micro.* 2008, v. 123, 1-8).

Se sugirió que la inhibición de *Salmonella typhimurim* y *Staphylococcus aureus* por el trans-2 hexenal se debe a su hidrofobicidad y formación de enlace de hidrógeno de su reparto en la bicapa lipídica. La destrucción de sistemas de transporte de electrones y la perturbación de la permeabilidad de la membrana también se han sugerido como

modos de acción (Gardini, F.; Lanciotti, R.; Guerzoni, M.E. Effect of trans-2-hexenal on the growth of *Aspergillus flavus* in relation to its concentration, temperature and water activity. *Letters in App. Microbiology*. 2001, v. 33, 50-55). La inhibición del deterioro por *P. expansum* puede deberse al daño a las membranas fúngicas de las conidias que germinan. (Neri, F.; Mari, M.; Menniti, A.; Brigati, S.; Bertolini, P. Control of *Penicillium expansum* in pears and apples by trans-2-hexenal vapours. *Postharvest Biol. and Tech.* 2006, v. 41, 101-108; Neri, F.; Mari, M.; Menniti, A. M.; Brigati, S. Activity of trans-2-hexenal against *Penicillium expansum* in 'Conference' pears. *J. Appl. Microbiol.* 2006, v.100, 1186-1193).

Se han llevado a cabo estudios para comparar el trans-2-hexenal con compuestos similares. Deng et. al. mostraron que los compuestos volátiles insaturados, trans-2-hexenal y trans-2-hexen-1-ol, presentaban un mayor efecto inhibitorio que los compuestos volátiles saturados, hexanal y 1-hexanol (Deng, W.; Hamilton-Kemp, T.; Nielsen, M.; Anderson, R.; Collins, G.; Hilderbrand, D. Effects of Six-Carbon Aldehydes and Alcohols on Bacterial Proliferation. *J. Agric. Food Chem.* 1993, v. 41, 506-510). El trans-2-hexenal era más activo que el hexanal, nonanal y trans-2-octenal contra cepas de bacterias de ATCC (Bisignano, G.; Lagana, M. G.; Trombetta, D.; Arena, S.; Nostro, A.; Uccella, N.; Mazzanti, G.; Saija, A. In vitro antibacterial activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea* L. *FEMS Microbiology Letters*. 2001, v. 198, 9-13). Otros han encontrado que el (*E*)-2-hexenal tenía menores concentraciones mínimas de inhibición del crecimiento fúngico que el hexanal, 1-hexanol, (*E*)-2-hexen-1-ol, y (*Z*)-3-hexen-1-ol como se determinó para varias especies de mohos, básicamente aldehídos > cetonas > alcoholes (Andersen, R. A.; Hamilton-Kemp, T.; Hilderbrand, D. F.; McCracken Jr., C. T.; Collins, R. W.; Fleming, P. D. Structure-Antifungal Activity Relationships among Volatile C₆ and C₉ Aliphatic Aldehydes, Ketones, and Alcohols. *J. Agric. Food Chem.* 1994, v. 42, 1563-1568). El hexenal y el ácido hexanoico eran más eficaces que el hexanol en la inhibición de salmonella (Kubo, I. y K. Fujita, Naturally Occurring Anti-Salmonella Agents. *J. Agric. Food Chem.* 2001, v. 49, 5750-5754).

Muroi et al. sugirieron que el trans-2-hexenal presentaba actividad antimicrobiana amplia pero su actividad biológica (50 a 400 µg/ml) normalmente no es suficientemente potente para considerarla para aplicaciones prácticas (Muroi, H.; Kubo, A.; Kubo, I. Antimicrobial Activity of Cashew Apple Flavor Compounds.. *J. Agric. Food Chem.* 1993, v. 41, 1106-1109). Los estudios han mostrado que el trans-2-hexenal puede potenciar la eficacia de determinados tipos de antimicrobianos. Varias patentes sugieren el uso de potenciadores para antibióticos aminoglucósidos (patente de EE.UU. 5.663.152), y potenciadores para antibióticos polimixinas (patente de EE.UU. 5.776.919 y patente de EE.UU. 5.587.358). Estos potenciadores incluyen indol, anetol, 3-metilindol, ácido 2-hidroxi-6-R-benzoico o 2-hexenal. Se observó un efecto sinérgico fuerte cuando el trans-2-heptenal, trans-2-nonenal, trans-2-decenal y (*E,E*)-2,4-decadienal se ensayaron juntos (relación 1:1:1:1) contra cepas microbianas de ATCC y clínicamente aisladas (Bisignano, G.; Lagana, M. G.; Trombetta, D.; Arena, S.; Nostro, A.; Uccella, N.; Mazzanti, G.; Saija, A. In vitro antibacterial activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea* L. *FEMS Microbiology Letters*. 2001, v. 198, 9-13).

Los seres humanos están expuestos diariamente al trans-2-hexenal por el consumo de alimentos y bebidas. Las exposiciones humanas al trans-2-hexenal son ~350 µg/kg/día, con 98% derivado de fuentes naturales y 2% de aromas artificiales. No es probable que el trans-2-hexenal sea tóxico para seres humanos puesto que los niveles tóxicos en ratas son 30 veces superiores que la ingesta normal por seres humanos (Stout, M. D.; Bodes, E.; Schoonhoven, R.; Upton, P. B.; Travlos, G. S.; Swenberg, J. A. Toxicity, DNA Binding, and Cell Proliferation in Male F344 Rats following Short-term Gavage Exposures to Trans-2-Hexenal. *Soc. Toxicologic. Pathology* March 24 2008, 1533-1601 en la red). En otro estudio con ratas, la alimentación con trans-2-hexenal con niveles en la dieta de 0 (control), 260, 640, 1600 o 4000 ppm administrados durante 13 semanas, no indujo ningún cambio en los parámetros hematológicos o pesos de órganos. Con 4000 ppm hubo una reducción en el peso corporal e ingesta, pero no era significativo (Gaunt, I. F.; Colley, J. Acute and Short-term Toxicity Studies on trans-2-Hexenal. *Fd Cosmet. Toxicol.* 1971, v. 9, 775-786).

Incluso en frutas, de veinticuatro horas a siete días de exposición de peras y manzanas a trans-2-hexenal (12,5 µl/l) no afectó al aspecto, color, firmeza, contenido de sólidos o acidez valorable de la fruta. En un panel entrenado para pruebas, no se observaron diferencias significativas en la cualidad organoléptica de manzanas "Golden Delicious" no tratadas y tratadas con trans-2-hexenal, mientras que se percibió la permanencia de sabores extraños en las frutas "Bartlett", "Abate Fetel" y "Royal Gala" (Neri, F.; Mari, M.; Menniti, A.; Brigati, S.; Bertolini, P. Control of *Penicillium expansum* in pears and apples by trans-2-hexenal vapours. *Postharvest Biol. and Tech.* 2006, 41, 101-108; Neri, F.; Mari, M.; Menniti, A. M.; Brigati, S. Activity of trans-2-hexenal against *Penicillium expansum* in 'Conference' pears. *J. Appl. Microbiol.* 2006, v.100, 1186-1193).

Se ha encontrado que el citral y el cinamaldehído son antifúngicos. El modo de acción de estos aldehídos es reaccionando con el grupo sulfuro (-SH) de hongos (Ceylan E y D Fung. Antimicrobial Activity of Spices. *J. Rapid Methods in Microbiology*. 2004 v.12, 1-55).

La patente de EE.UU. 6.750.256 y patente de EE.UU. RE 39543 sugieren el uso de aldehídos aromáticos como el aldehído α-hexilcinámico para el control de la población de hormigas, pero no sugieren ningún efecto sinérgico del aldehído en combinación con un ácido orgánico para mejorar la eficacia o una reducción del ingrediente activo o su eficacia en el control bacteriano.

- 5 El aceite esencial de *Coriandrum sativum* contiene 55,5% de aldehídos que han sido eficaces para prevenir el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Estos aldehídos incluyen: n-octanal, nonanal, 2E-hexenal, decanal, 2E-decenal, undecenal, dodecanal, 2E-dodecenal, tridecanal, 2E-trideceno-1-al y 3-dodecen-1-al (Matasyoh, J.C., Z.C. Maiyo, R.R. Ngure y R. Chepkorir. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Coriandrum sativum*. *Food Chemistry*. 2009 v.113, 526-529).
- El furfural, un aldehído cíclico, se usa actualmente como fungicida y nematocida, pero no hay informes sobre su uso en combinación con un ácido orgánico, es decir, el ácido nonanoico, como se demuestra en la presente invención.
- 10 Dos aldehídos, el n-decanal y nonanal, son eficaces en el control del crecimiento bacteriano (Dilantha Fernando, W.G., R. Ramaranthnam, A. Krihnamoorthy y S. Savchuck. Identification and use of potential organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biology and Biochemistry*. 2005 v.37, 955-964).
- La técnica anterior no ha sugerido u observado que el uso de aldehídos en combinación con ácidos orgánicos mejore la actividad antimicrobiana de ninguno de los componentes por sí mismos. Se ha sugerido sinergia con la combinación de aceites esenciales y como potenciadores de antibióticos.
- 15 Los inhibidores de mohos y bactericidas comerciales están compuestos de un solo ácido orgánico o una mezcla de ácidos orgánicos y formaldehído. Estos ácidos son principalmente ácido propiónico, ácido benzoico, ácido butírico, ácido acético y ácido fórmico. Los ácidos orgánicos han sido un aditivo principal para reducir la incidencia de las infecciones de transmisión alimentaria. El mecanismo por el cual ácidos grasos de cadena corta ejercen su actividad antimicrobiana es que los ácidos no disociados ($\text{RCOOH} = \text{no ionizado}$) son permeables en lípidos y de esta forma pueden cruzar la pared de células microbianas y disociarse en el interior del microorganismo más alcalino ($\text{RCOOH} \rightarrow \text{RCOO}^- + \text{H}^+$) haciendo al citoplasma inestable para la supervivencia. (Van Immerseel, F., J.B. Russell, M.D. Flythe, I. Gantois, L. Timbermont, F. Pasmans, F. Haesebrouck, y R. Ducatelle. 2006. The use of organic acids to combat Salmonella in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy, *Avian Pathology*. v. 35, no.3, 182-188; Paster, N. 1979, A commercial study of the efficiency of propionic acid and acid and calcium propionate as fungistats in poultry feed, *Poult. Sci.* v. 58, 572-576).
- 20 El ácido pelargónico (ácido nonanoico) es un ácido graso natural. Es un fluido aceitoso, incoloro, que a menor temperatura se vuelve sólido. Tiene un olor débil comparado con el ácido butírico y es prácticamente insoluble en agua. El ácido pelargónico se ha usado como un herbicida no selectivo. Scythe (57% de ácido pelargónico, 3% de ácidos grasos relacionados y 40% de material inerte) es un herbicida de efecto quemado o post-brote de amplio espectro de Mycogen/Dow Chemicals. El modo de acción herbicida del ácido pelargónico se debe primero a la fuga de la membrana durante la oscuridad y luz del día y segundo por la peroxidación dirigida por radicales que se originan durante la luz del día por la clorofila sensibilizada desplazada de la membrana tilacoidal (B. Lederer, T. Fujimori., Y. Tsujino, K. Wakabayashi y P. Boger, 2004. Phytotoxic activity of middle-chain fatty acids II: peroxidation and membrane effects. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 80: 151-156).
- 25 ChadeGANIPOUR y HAIMS (2001) mostraron que la concentración mínima inhibidora (CMI) de ácidos grasos de cadena media para prevenir el crecimiento de *M. gypseum* era ácido cáprico 0,02 mg/ml y para el ácido pelargónico 0,04 mg/ml en medio sólido y ácido cáprico 0,075 mg/ml y ácido pelargónico 0,05 mg/ml en medio líquido. Estos ácidos se ensayaron independientemente y no como una mezcla ("Antifungal activities of pelargonic and capric acid on *Microsporium gypseum*" *Mycoses* v. 44, no 3-4, 109-112). N. Hirazawa, et al. (Antiparasitic effect of medium-chain fatty acids against ciliated Crptocaryon irritans infestation in the red sea bream Pagrus major, 2001, *Aquaculture* v. 198, 219-228) encontraron que el ácido nonanoico, así como ácidos grasos C6 a C10, eran eficaces para controlar el crecimiento del parásito *C. irritans* y que los C8, C9 y C19 eran los más potentes. Se encontró que *Trichoderma harzianum*, un biocontrol para plantas de cacao produce ácido pelargónico como uno de los muchos productos químicos, que era eficaz en el control de la germinación y crecimiento de patógenos del cacao. (M Aneja, T. Gianfagna y P. Hebbar, 2005).
- 35 Varias patentes de EE.UU. describen el uso de ácidos pelargónicos como fungicidas y bactericidas: la solicitud publicada de EE.UU. 2004/026685 describe un fungicida para usos agrícolas que está compuesto de uno o más ácidos grasos y uno o más ácidos orgánicos diferentes del ácido graso. En la mezcla de los ácidos orgánicos y los ácidos grasos, el ácido orgánico actúa como un potente agente sinérgico para el ácido graso para funcionar como fungicida. La patente de EE.UU. 5.366.995 describe un método para erradicar las infecciones fúngicas y bacterianas en plantas y potenciar la actividad de fungicidas y bactericidas en plantas por el uso de ácidos grasos y sus derivados. Esta formulación contiene 80% de ácido pelargónico o sus sales para el control de hongos de plantas. Los ácidos grasos usados son principalmente C9 a C18. La patente de EE.UU. 5.342.630 describe un nuevo pesticida para uso en plantas que contiene una sal inorgánica que potencia la eficacia de ácidos grasos C8 a C22. Uno de los ejemplos muestra un producto potenciador con 2% de ácido pelargónico, 2% de ácido cáprico, 80% de talco, 10% de carbonato sódico y 5% de carbonato potásico. La patente de EE.UU. 5.093.124 describe un fungicida y artropocida para plantas que comprende ácidos alfa-monocarboxílicos y sus sales. Preferiblemente el fungicida consiste en ácidos grasos C9 a C10, parcialmente neutralizados por metales alcalinos activos tales como potasio. La mezcla descrita consiste en 40% de ingrediente activo disuelto en agua e incluye 10% de ácido pelargónico, 10% de ácido cáprico y 20% de ácidos grasos de coco, todos los cuales están neutralizados con hidróxido potásico. La
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

5 C6 a C18 o sus derivados. La patente de EE.UU. 6.103.768 y la patente de EE.UU. 6.136.856 describen la utilidad única de ácidos grasos y derivados para erradicar infecciones fúngicas y bacterianas existentes en plantas. Este método no es preventivo, pero mostraba eficacia en infecciones ya establecidas. Sharpshooter, un producto disponible en el comercio, con 80% de ácido pelargónico, 2% de emulsionante y 18% de tensioactivo mostraba eficacia contra *Penicillium* y *Botrytis* spp. La patente de EE.UU. 6.638.978 describe un conservante antimicrobiano compuesto de un éster de glicerol y ácido graso, una mezcla binaria de ácidos grasos (C6 a C18) y un segundo ácido graso (C6 a C18) donde el segundo ácido graso es diferente del primer ácido graso, para la conservación de alimentos. El documento WO 01/97799 describe el uso de ácidos grasos de cadena media como agentes antimicrobianos. Muestra que un aumento del pH de 6,5 a 7,5 aumentaba la CMI de los ácidos grasos de cadena corta que contienen cadenas de 6-8 carbonos.

10 El ácido pelargónico se usa como un componente de una solución desinfectante para de superficies de contacto con alimentos en establecimientos de manipulación de alimentos. Un producto de EcoLab consiste en 6,49% de ácido pelargónico como ingrediente activo para usar como un desinfectante para todas las superficies de contacto con alimentos (12CFR178.1010 b). La FDA ha autorizado el ácido pelargónico como un agente aromático sintético de alimentos (21 CFR 172.515), como un adyuvante, ayudante de producción y desinfectante para usar en contacto con alimentos (12 CFR 178.1010 b) y en el lavado o para ayudar al pelado con lejía de frutas y verduras (12 CFR 173.315). El ácido pelargónico está listado por la USDA en la lista de Sustancias Autorizadas de la USDA, 1990, sección 5.14, Compuestos para el lavado de frutas y verduras.

15 El documento WO2012027140, un documento de la técnica anterior bajo Art. 54(3) EPC, describe composiciones antimicrobianas que comprenden mezclas de diferentes ácidos orgánicos tales como ácido acético, propanoico y pelargónico con trans-2-hexenal y varios otros aldehídos que incluyen otros aldehídos alifáticos α,β -insaturados, así como métodos de uso de las composiciones para tratar pienso para animales. El documento WO2011017367 describe composiciones antibacterianas que comprenden mezclas de ácidos orgánicos C2:C9, C2:C3:C9, y C3:C9 con tensioactivos y terpenos opcionales para usar en el tratamiento de pienso para animales.

20 La presente invención se refiere solo al uso de algunos aldehídos extraídos de plantas o sintetizados químicamente que mejoran de forma sinérgica la capacidad antimicrobiana de estos compuestos por la adición de ácidos orgánicos, en especial ácido nonanoico.

Resumen de la invención

25 Un objeto de la presente invención es proporcionar una composición que mejora de forma sinérgica el efecto microbicida de ácidos orgánicos y aldehídos.

La composición de acuerdo con la invención se define en la reivindicación 1.

La composición es eficaz contra diferentes hongos presentes en piensos e ingredientes principales de piensos.

La composición es eficaz contra diferentes bacterias presentes en piensos e ingredientes principales de piensos.

La composición es eficaz contra diferentes bacterias y hongos presentes en el agua.

30 La composición es eficaz contra microbios perjudiciales para la producción de alcohol a partir de la fermentación de celulosa, almidón o azúcares.

Descripción de las realizaciones preferidas

En esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones que siguen, se hará referencia a una serie de términos que se definirán para tener los siguientes significados.

40 Definiciones

Un "porcentaje en volumen" de un componente se basa en el volumen total de la formulación o composición en la que está incluido el componente.

45 Un ácido orgánico de la composición puede comprender ácido fórmico, acético, propiónico, butírico, pelargónico, láctico y otros ácidos grasos C₂ a C₂₄ o mono, di o triglicéridos que contienen ácidos grasos C₁ a C₂₄. Estos ácidos grasos comprenden ácidos grasos de cadena corta, cadena media, cadena larga o triglicéridos de cadena corta, cadena media, cadena larga.

50 La expresión "cantidad eficaz" de un compuesto significa una cantidad capaz de realizar la función del compuesto o propiedad para la que se expresa una cantidad eficaz, tal como una cantidad no tóxica pero suficiente del compuesto para proporcionar los beneficios antimicrobianos deseados. Por lo tanto, una cantidad eficaz adecuada puede ser determinada por un experto en la técnica usando solo experimentación rutinaria.

Las formulaciones pueden variar no solo en concentración de los componentes principales, es decir, ácidos orgánicos, sino también en el tipo de aldehídos y concentración de agua usados. Esta invención se puede modificar

de diferentes formas añadiendo o eliminando de la formulación el tipo de ácido orgánico y aldehído.

Por los términos “efecto sinérgico o sinergia” de la composición se entiende la mejora del efecto conservante cuando los ingredientes se añaden como una mezcla en lugar de como componentes individuales.

Composición(es)

- 5 Una composición de la presente invención se define en la reivindicación 1.

Métodos

La presente invención es eficaz contra bacterias y hongos.

La presente invención se aplica al agua.

La presente invención se aplica a la materia prima antes de entrar en la mezcladora.

- 10 La presente invención se aplica a las materias primas no mezcladas en la mezcladora.

La presente invención se aplica durante la mezcla de los ingredientes materias primas.

La presente invención se aplica en forma líquida o como un producto seco mezclado con un vehículo.

La presente invención se aplica en una forma tal que proporcione una distribución uniforme y homogénea de la mezcla por todo el pienso.

- 15 Uno de los objetivos de la presente invención es controlar el nivel de microbios en pienso y forraje. Varias mezclas de ácidos orgánicos y aldehídos dieron como resultado varias formulaciones que mostraban eficacia frente a bacterias en tampones y piensos. Otro objetivo de la presente invención es formular un antimicrobiano con compuestos naturales o seguros para usar compuestos. Todos los productos químicos usados en la presente invención están aprobados actualmente para usos humanos como antimicrobianos, potenciadores del sabor y perfumería.

20 Había resultados inesperados, es decir, sinergia y efecto aditivo, cuando se usaron los ácidos orgánicos y aldehídos.

Los ejemplos 1-6 tienen solo fines ilustrativos.

Ejemplo 1

- 25 Se añadieron formaldehído y/o ácido pelargónico a tubos de ensayos en las concentraciones mostradas en la tabla 1. Las soluciones se mezclaron con agitación vorticial durante 10 segundos para asegurar el mezclamiento. Había tres tubos repetidos por tratamiento. Se añadió una suspensión de *Salmonella typhimurium* (10^3 ufc/ml, ATCC nº 14028) a los tres tubos de ensayo que contenían cada formulación. Estas soluciones se mezclaron con agitación vorticial y se incubaron a temperatura ambiente durante 24 h y se cultivaron en SMA (Agar para métodos estándar) durante 24 horas antes de contar las colonias de Salmonella.

- 30 La eficacia de cada formulación como un porcentaje de reducción comparado con su valor de control se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 1. Interacción del ácido pelargónico y formaldehído

Producto de ensayo	Formaldehído (%)	Ácido pelargónico (%)	Reducción de Salmonella %
Control	0	0	0
Formaldehído	0,025	0	90,8
	0,0125	0	59,0
	0,00625	0	39,3
	0,00312	0	17,3
Ácido pelargónico	0	0,0025	0
	0	0,00125	0
	0	0,000625	0
	0	0,000312	0
HCHO: Pelargónico	0,025	0,0025	94,2
	0,0125	0,0025	61,0
	0,00625	0,0025	40,7
	0,00312	0,0025	26,1
	0,025	0,00125	92,5
	0,0125	0,00125	52,5
	0,00625	0,00125	38,6
	0,00312	0,00125	27,8
	0,025	0,000625	83,1
	0,0125	0,000625	54,6
	0,00625	0,000625	45,4
	0,00312	0,000625	18,6
	0,025	0,000312	90,2
	0,0125	0,000312	57,6
	0,00625	0,000312	39,7
	0,00312	0,000312	22,7

5 Se observó una curva de respuesta a la dosis con formaldehído y los tratamientos de formaldehído:ácido pelargónico. El ácido pelargónico con la dosis más alta ensayada no era bactericida. El ácido pelargónico al 0,00125 y 0,0025% parecía aumentar la eficacia del formaldehído.

Ejemplo 2

10 Se añadió formaldehído y/o ácido pelargónico a tubos de ensayo en las concentraciones mostradas en la tabla 2. Las soluciones se mezclaron con agitación vorticial durante 10 segundos para asegurar el mezclamiento. Había tres tubos repetidos por tratamiento. Se añadió una suspensión de *Salmonella typhimurium* (10^3 ufc/ml, ATCC n° 14028) a los tres tubos de ensayo que contenían cada formulación. Estas soluciones se mezclaron con agitación vorticial y se incubaron a temperatura ambiente durante 24 h y se cultivaron en SMA (Agar para métodos estándar) durante 24 horas antes de contar las colonias de Salmonella. La eficacia de cada formulación como un porcentaje de reducción comparado con su valor de control se muestra en la siguiente tabla.

Producto de ensayo	Formaldehído (%)	Ácido pelargónico (%)	Reducción de Salmonella %
Control	0	0	0
Formaldehído	0,025	0	88,3
	0,0125	0	50,5
	0,00625	0	41,0
	0,00312	0	17,7
Ácido pelargónico	0	0,01	100
	0	0,005	96,5
	0	0,0025	8,8
	0	0,00125	2,1
HCHO: Pelargónico	0,025	0,01	100
	0,025	0,005	98,6
	0,025	0,0025	97,2
	0,025	0,00125	91,9
	0,0125	0,01	100
	0,0125	0,005	100
	0,0125	0,0025	62,9
	0,0125	0,00125	37,8
	0,00625	0,01	100
	0,00625	0,005	99,6
	0,00625	0,0025	20,8
	0,00625	0,00125	38,2
	0,00312	0,01	100
	0,00312	0,005	97,2
	0,00312	0,0025	36,0
	0,00312	0,00125	0,4

Se observó una curva de respuesta a la dosis con formaldehído, ácido pelargónico y los tratamientos de formaldehído:ácido pelargónico. El ácido pelargónico al 0,00125 y 0,0025% no tenía un impacto significativo en la reducción de Salmonella. Sin embargo, cuando estos niveles de ácido pelargónico se mezclaron con formaldehído, mejoró la eficacia bactericida del formaldehído.

Ejemplo 3

Se prepararon cinco formulaciones para estudios in vitro, como se presenta en la tabla 3. Las formulaciones se añadieron a tubos de ensayo en concentraciones al 0,01% y 0,05%. Las soluciones se mezclaron con agitación vorticial durante 10 segundos para asegurar el mezclamiento. Había tres tubos repetidos por tratamiento.

Producto químico	1	2	3	4	5
Ácido acético	20	20	20	20	20
Ácido propiónico	50	50	50	50	50
Ácido pelargónico	5	10	15	20	25
Trans-2-Hexenal	25	20	15	10	5
TOTAL	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Se añadió una suspensión de *Salmonella typhimurium* (10^4 ufc/ml) a los tres tubos de ensayo que contenían las diferentes diluciones de cada formulación. Los tubos se mezclaron con agitación vorticial, se incubaron a temperatura ambiente durante 24 h y después se cultivaron en SMA (Agar para métodos estándar) durante 48 horas antes de contar las colonias de Salmonella. La eficacia de cada formulación como un porcentaje de reducción comparado con su valor de control se muestra en la siguiente tabla.

Tratamiento	Dilución 0,01%	Dilución 0,05%
Fórmula 1	80,6	100
Fórmula 2	73,0	99,5
Fórmula 3	52,3	97,7
Fórmula 4	41,4	96,8
Fórmula 5	18,9	93,7

El ácido pelargónico al 10% aumenta la eficacia del trans-2-hexenal.

Ejemplo 4

- 5 Se seleccionaron tres formulaciones del estudio 3 para ensayar su eficacia contra *Salmonella typhimurium* (ATCC n° 14028) en piensos. Se modificó pienso de aves de corral con un inóculo en harina de carne y hueso de *Salmonella typhimurium* con un nivel de 10^3 ufc/g de pienso. El pienso contaminado después se trató con 0, 1,5 o 2 kg/tm de las formulaciones citadas a continuación. Después de 24 horas, se suspendieron 10 g de submuestras de los piensos no tratados y tratados en 90 ml de tampón Butterfield. Las diluciones se cultivaron en agar XLT-4 y se incubaron a 37°C durante 48 horas antes de contar las colonias de Salmonella. Se tomaron muestras adicionales 7 días después de tratamiento para el recuento de Salmonella. Las formulaciones usadas se muestran en la siguiente tabla.

Producto químico	1	2	3
Ácido acético	20	20	20
Ácido propiónico	50	50	50
Ácido pelargónico	5	10	15
Trans-2-hexenal	25	20	15
Total	100	100	100

- 10 Resultados. La siguiente tabla muestra que todas las formulaciones eran eficaces contra la Salmonella. El aumento de nivel de ácido pelargónico dio como resultado una eficacia similar al nivel alto de hexenal.

Tratamiento	Kg/tm	% de reducción el día 1	% de reducción el día 7
Control	0	0	0
Fórmula n° 1	1,5	85,0	97,4
	2	93,8	98,9
Fórmula n° 2	1,5	75,6	94,3
	2	98,0	99,6
Fórmula n° 3	1,5	90,6	92,1
	2	91,8	96,6

Ejemplo 5

- 15 Se seleccionaron las cinco formulaciones del ejemplo 3 para ensayar su eficacia contra *Salmonella typhimurium*. Se modificó pienso de aves de corral con un inóculo en harina de carne y hueso de *Salmonella typhimurium*. El pienso contaminado después se trató con 0, o 2 kg/tm de las formulaciones. Después de 24 horas, se suspendieron 10 g de submuestras de los piensos tratados en 90 ml de tampón Butterfield. Las diluciones se cultivaron en agar XLT-4 y se incubaron a 37°C durante 48 horas antes de contar las colonias de Salmonella. Se tomaron muestras adicionales 7 días después de tratamiento para el recuento de Salmonella.

- 20 La siguiente tabla muestra que todas las formulaciones eran eficaces contra Salmonella.

Tratamiento	% de reducción a las 24 horas	% de reducción a los 7 días
Control	0	0
Fórmula 1	90,0	96,6
Fórmula 2	92,6	97,6
Fórmula 3	86,1	91,0
Fórmula 4	47,3	76,5
Fórmula 5	55,1	66,7

Concentraciones iguales de ácido pelargónico y trans-2-hexenal dieron como resultado eficacia similar a los niveles altos de trans-2-hexenal (25%).

Ejemplo 6

- 25 La fórmula 1 del ejemplo 3 compuesta de 25% de trans-2-hexenal, 5% de ácido pelargónico y 70% de ácidos orgánicos acuosos, se comparó con el trans-2-hexenal en cuanto a la actividad residual en el pienso. Pienso de aves de corral se trató con 0,1, 0,25, 0,5 o 1,0 kg/tm de hexenal comparado con 1 kg/tm del producto de combinación de hexenal:ácido pelargónico (0,25 kg/tm de hexenal). Los días 1, 6 y 13 después de tratamiento, el pienso se contaminó con inóculo en harina de carne y huesos de *Salmonella typhimurium* en un nivel de 10^3 ufc/g de pienso.
- 30 Después de 24 horas, 10 g de submuestras de pienso tratado y no tratado se suspendieron en 90 ml de tampón de Butterfield. Las diluciones se cultivaron en agar XLT-4 y se incubaron a 37°C durante 48 h antes del recuento de colonias de Salmonella.

La siguiente tabla compara el impacto del ácido pelargónico en la actividad residual del hexenal contra Salmonella.

Tratamiento	% de reducción a los 13 días
Control	0
mezcla de hexenal:pelargónico (hexenal 0,25 kg/tm)	93,5
hexenal 0,10 kg/tm	0
hexenal 0,25 kg/tm	0
hexenal 0,50 kg/tm	77,4
hexenal 1,00 kg/tm	87,1

La adición de ácido pelargónico (5%) al trans-2-hexenal dio como resultado mejor eficacia contra Salmonella que el propio trans-2-hexenal.

5 Ejemplo 7

Se mezclaron siete aldehídos (butiraldehído, citral, aldehído undecilénico, decadienal, cinamaldehído, decanal y furfural) con trans-2-hexenal, ácido pelargónico, ácido propiónico y ácido acético como se presenta en la tabla 9. Se incluyeron un 20% (X-1) y un 25% (F18) de producto de hexenal:ácido orgánico como controles positivos. Las formulaciones se añadieron al tubo de ensayo en concentración de 0,1%, 0,05%, 0,01% y 0,005%. Las soluciones se mezclaron con agitación vorticial durante 10 segundos para mezclar uniformemente la solución. Había tres tubos repetidos por tratamiento. Se añadió una suspensión de *Salmonella typhimurium* (10^4 ufc/ml) a los tres tubos de ensayo que contenían la diferente dilución de cada formulación. Las soluciones se mezclaron con agitación vorticial y se incubaron a temperatura ambiente durante 24 h y después se cultivaron en agar XLT-4 durante 48 horas antes de contar las colonias de Salmonella.

15 La eficacia de cada formulación como un porcentaje de reducción comparado con su valor de control se muestra en las siguientes tablas.

FÓRMULAS	F18	X-1	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74
Ácido pelargónico	5	10	5	5	5	5	5	10	10	10	10	10
Ácido acético (56%)	20	20	20	20	20	20	25	15	15	15	15	20
2-hexenal	25	20	20	15	10	5	0	20	15	10	5	0
Ácido propiónico	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Butiraldehído			5	10	15	20	20	5	10	15	20	20
	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
% de reducción del crecimiento de Salmonella												
Concentración	F18	X-1	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74
0,005%	26,7	21,2	26,7	9,1	4,2	0	0	9,1	15,2	1,2	0	0
0,01%	70,9	52,1	44,8	40,0	11,5	0	0	67,3	38,2	6,7	0	0
0,05%	100	100	100	100	94,5	69,7	0	100	99,4	95,2	77,0	0

FÓRMULAS	F18	X-1	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
Ácido pelargónico	5	10	5	10	5	5	5	5	5	5	10	10
Ácido acético (56%)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	25	15	15
2-hexenal	25	20	25	20	10	20	15	10	5	0	20	15
Ácido propiónico	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Citral			5	10	15	20	20	5	10	15	20	20
	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
% de reducción del crecimiento de Salmonella												
Concentración	F18	X-1	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
0,005%	26,7	21,2	23,6	33,9	44,8	43,0	29,1	19,4	45,5	36,4	37,0	38,2
0,01%	70,9	52,1	70,3	63,0	63,0	77,0	33,3	68,5	60,6	60,6	53,3	30,9
0,05%	100	100	100	100	100	100	90,0	100	100	100	100	94,5

ES 2 618 638 T3

Tabla 11: Efecto de aldehído undecilénico, hexenal y ácido pelargónico en Salmonella												
FÓRMULAS	F18	X-1	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104
Ácido pelargónico	5	10	5	10	5	5	5	5	5	5	10	10
Ácido acético (56%)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	25	15	15
2-hexenal	25	20	25	20	10	20	15	10	5	0	20	15
Ácido propiónico	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Aldehído undecilénico			5	10	15	20	20	5	10	15	20	20
	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
% de reducción en el crecimiento de Salmonella												
Concentración	F18	X-1	F95	F96	F97	F98	F99	F100	F101	F102	F103	F104
0,005%	0	0	5,9	20,1	29,6	47,2	85,1	16,1	14,7	21,5	50,6	29,6
0,01%	38,4	19,5	60,7	52,6	74,3	79,7	90,5	49,2	69,5	41,1	51,9	62,1
0,05%	100	100	99,3	100	100	100	98,6	100	100	100	99,3	89,8

Tabla 12: Efecto de decadienal, hexenal y ácido pelargónico en Salmonella													
FÓRMULAS	F18	X-1	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	
Ácido pelargónico	5	10	5	10	5	5	5	5	5	5	10	10	
Ácido acético (56%)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	25	15	15	
2-hexenal	25	20	25	20	10	20	15	10	5	0	20	15	
Ácido propiónico	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	
2,4-decadienal			5	10	15	20	20	5	10	15	20	20	
	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
% de reducción en el crecimiento de Salmonella													
Concentración	F18	X-1	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	
0,005%	0	0	74,3	72,9	83,1	70,2	79,7	49,2	81,7	87,8	90,5	93,9	
0,01%	38,4	19,5	98,0	94,6	93,2	92,6	96,6	91,9	99,3	98,6	99,3	91,2	
0,05%	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	

Tabla 13: Efecto de cinamaldehído, hexenal y ácido pelargónico en Salmonella												
FÓRMULAS	F18	X-1	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114
Ácido pelargónico	5	10	5	10	5	5	5	5	5	5	10	10
Ácido acético (56%)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	25	15	15
2-hexenal	25	20	25	20	10	20	15	10	5	0	20	15
Ácido propiónico	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Cinamaldehído			5	10	15	20	20	5	10	15	20	20
	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
% de reducción en el crecimiento de Salmonella												
Concentración	F18	X1	F105	F106	F107	F108	F109	F110	F111	F112	F113	F114
0,005%	50,3	29,9	31,0	39,9	26,8	5,9	21,6	31,5	24,7	22,6	37,8	23,1
0,01%	73,3	50,3	59,2	62,9	44,6	45,6	18,4	66,0	55,6	57,1	45,6	15,3
0,05%	100	100	100	100	100	100	84,8	100	100	100	100	90,6

Tabla 14: Efecto de decanal, hexenal y ácido pelargónico en Salmonella												
FÓRMULAS	F18	X-1	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124
Ácido pelargónico	5	10	5	10	5	5	5	5	5	5	10	10
Ácido acético (56%)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	25	15	15
2-hexenal	25	20	25	20	10	20	15	10	5	0	20	15
Ácido propiónico	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Decanal			5	10	15	20	20	5	10	15	20	20
	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
% de reducción en el crecimiento de Salmonella												
Concentración	F18	X1	F115	F116	F117	F118	F119	F120	F121	F122	F123	F124
0,005%	50,3	29,9	39,9	47,2	56,6	77,5	88,5	51,9	45,1	70,7	92,7	91,6
0,01%	73,3	50,3	61,8	89,0	93,7	94,2	94,8	67,6	74,4	86,9	93,2	94,8
0,05%	100	100	100	100	100	100	97,4	100	100	100	100	97,4

Tabla 15: Efecto de furfural, hexenal y ácido pelargónico en Salmonella												
FÓRMULAS	F18	X-1	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134
Ácido pelargónico	5	10	5	10	5	5	5	5	5	5	10	10
Ácido acético (56%)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	25	15	15
2-hexenal	25	20	25	20	10	20	15	10	5	0	20	15
Ácido propiónico	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Furfural			5	10	15	20	20	5	10	15	20	20
	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
% de reducción en el crecimiento de Salmonella												
Concentración	F18	X1	F125	F126	F127	F128	F129	F130	F131	F132	F133	F134
0,005%	50,3	29,9	33,6	40,4	41,4	34,1	41,4	28,9	29,9	39,3	24,7	47,7
0,01%	73,3	50,3	63,4	43,5	33,6	34,1	36,7	78,6	41,4	33,1	29,9	28,9
0,05%	100	100	100	97,9	95,8	81,7	0	100	100	90,6	80,1	6,4

Resultados:

1. Con 5% de ácido pelargónico, el butiraldehído por sí mismo no es tan eficaz como el trans-2-hexenal.
- 5 2. Con 10% ácido de pelargónico, 20% de butiraldehído no era tan eficaz como 20% de trans-2-hexenal.
3. Tanto con 5% como 10% de ácido pelargónico, el butiraldehído puede sustituir parcialmente al trans-2-hexenal.
4. Con 5% de ácido pelargónico, el citral por sí mismo no es tan eficaz como el trans-2-hexenal.
5. Con 10% de ácido pelargónico, 20% de citral era tan eficaz como 20% de trans-2-hexenal.
6. Tanto con 5% como con 10% de ácido pelargónico, el citral puede sustituir parcialmente al trans-2-hexenal.
- 10 7. Tanto con 5% como con 10% de ácido de pelargónico, el aldehído undecilénico puede sustituir al trans-2-hexenal.
8. Tanto con 5% como con 10% de ácido pelargónico, el aldehído decadienal puede sustituir al trans-2-hexenal.
9. Tanto con 5% como con 10% de ácido pelargónico, el cinamaldehído puede sustituir al trans-2-hexenal.
10. Tanto con 5% como con 10% de ácido pelargónico, el decanal puede sustituir al trans-2-hexenal.
11. Tanto con 5% como con 10% de ácido pelargónico, el furfural puede sustituir al trans-2-hexenal.
- 15 12. Todas las formulaciones ensayadas eran tan eficaces, y en algunos casos mejores, como una fórmula positiva con 25% o 20% de trans-2-hexenal o la formulación de fórmico/propiónico.

Conclusión:

El ácido pelargónico potencia la eficacia de cada aldehído individual y la combinación de aldehídos.

REIVINDICACIONES

1. Una composición antimicrobiana para prolongar la vida en anaquel del agua, pienso o ingredientes del pienso, que comprende:
 - 5 - 15% en peso de ácido nonanoico,
- 5 10 - 20% en peso de ácido acético,
 - 40 - 50% en peso de ácido propiónico,
 - 5 - 30% en peso de trans-2-hexenal, y
 - 5 - 30% en peso de butiraldehído, aldehído undecilénico, 2,4-decadienal, cinamaldehído, decanal o furfural.
2. Un método para prolongar la vida en anaquel del agua, pienso o ingredientes del pienso, que comprende:
 - 10 tratar por pulverización o mezclar con agua, pienso o ingredientes del pienso, una cantidad eficaz de una composición que comprende
 - 5 - 15% en peso de ácido nonanoico,
 - 10 - 20% en peso de ácido acético,
 - 40 - 50% en peso de ácido propiónico,
 - 15 5 - 30% en peso de trans-2-hexenal, y
 - 5 - 30% en peso de butiraldehído, aldehído undecilénico, 2,4-decadienal, cinamaldehído, decanal o furfural.
3. El método de la reivindicación 2, en donde la composición es eficaz contra bacterias, virus, micoplasmas u hongos presentes en el agua para beber, pienso o ingredientes del pienso.
4. El método de la reivindicación 2, en donde dicha composición contiene:
 - 20 5 - 15% en peso de ácido nonanoico,
 - 10 - 20% en peso de ácido acético,
 - 40 - 50% en peso de ácido propiónico,
 - 5 - 30% en peso de trans-2-hexenal, y
 - 5 - 30% en peso de 2,4-decadienal.