

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 964**

51 Int. Cl.:

A23K 20/10 (2006.01)
A23K 20/111 (2006.01)
A23K 50/75 (2006.01)
A01N 31/16 (2006.01)
A01N 35/02 (2006.01)
A01N 37/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.08.2011 PCT/US2011/047693**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.03.2012 WO12027140**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2011 E 11820383 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 2611310**

54 Título: **Formulación antimicrobiana**

30 Prioridad:

27.08.2010 US 377819 P

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

07.11.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

PIMENTEL, JULIO

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 640 964 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

Formulación antimicrobiana.

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

- 5 Una formulación antimicrobiana sinérgica que contiene una mezcla de ácidos orgánicos, aldehídos α,β -insaturados y terpenos antimicrobianos.

Antecedentes

10 Un estudio reciente 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. Se calcula que 76 millones de personas en los EE.UU. se ponen enfermos cada año por enfermedades de transmisión alimentaria y 5.000 mueren, de acuerdo con los Centros de Control y Prevención de Enfermedades de EE.UU. (Thomson Reuters 2010, 3/10/2010).

15 Existe el deseo de encontrar antimicrobianos más naturales y/u orgánicos, que ha dado como resultado una gran cantidad de investigación, y mayor coste de materias primas debido a la baja disponibilidad comercial de estos nuevos productos naturales/orgánicos.

20 Se han encontrado varios antimicrobianos nuevos en plantas. Los autores de la invención han encontrado que cuando la hierba u otras plantas son dañadas al cortarlas, podarlas o ser expuestas a patógenos, se activa la ruta de la lipoxigenasa y esta conduce a la producción de compuestos que presentan actividad antimicrobiana. Las lipoxigenasas son enzimas ampliamente distribuidas en la naturaleza que catalizan la oxidación de ácidos grasos insaturados, formando hidroperóxidos de ácidos grasos, que actúan como sustratos para la síntesis de compuestos con funciones importantes en la defensa de la planta (Kishimoto, K.; Matsui, K.; Ozawa, R.; Takabayashi, J. "Direct fungicidal activities of C6-aldehydes are important constituents for defense responses in Arabidopsis against *Botrytis cinerea*." *Phytochemistry* 2008, v. 69, 2127-2132; 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).

Los aldehídos se representan por la fórmula general HCHO, donde R puede ser hidrógeno o un grupo alifático, aromático, o heterocíclico. Los aldehídos alifáticos α,β -insaturados de importancia comercial tienen de tres a diez unidades de carbono. Son moderadamente solubles en agua y la solubilidad disminuye al aumentar el peso molecular.

30 Los aldehídos alifáticos α,β -insaturados incluyen 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-dodecanal, y otros. La presente invención incluye aldehídos alifáticos α,β -insaturados C3 a C12.

35 La rotura de grasas y fosfolípidos conduce a la formación de tres aldehídos de seis a nueve átomos de carbono, dentro de ellos el (2E,6Z)-nonadienal, *trans*-2-nonaenal y *trans*-2-hexenal. Estos compuestos son producidos enzimáticamente por la acción combinada de dos enzimas diferentes de la ruta de la lipoxigenasa (LOX) de las plantas. En la primera reacción, la LOX cataliza la oxigenación de ácidos grasos poliinsaturados, tales como los ácidos linoleico y linolénico, con la consiguiente formación de 9 o 13-hidroperóxidos. Estos compuestos son muy inestables y son escindidos a aldehídos y oxoácidos por la enzima hidroperóxido liasa (HPL). Partiendo del 9-hidroperoxi, se obtienen el *trans*-2-nonaenal y el (2E,6Z)-nonadienal, mientras que se obtienen el hexenal y *trans*-2-hexenal a partir de derivados de 13-hidroperoxi. En la segunda reacción, estos aldehídos se pueden convertir en los correspondientes alcoholes por acción de la alcohol deshidrogenasa (Hubert, J.; Munzbergova, Z.; Santino, A. "Plant volatile aldehydes as natural insecticides against stored-product beetles." *Pest Manag. Sci.* 2008, v. 64, 57-64).

45 El compuesto volátil usado en esta invención es el *trans*-2-hexenal, que es un aldehído con doble enlace, de seis carbonos, C₆H₁₀O y PM=98,14. El *trans*-2-hexenal, natural o sintético, conocido también como aldehído de las hojas, se considera un aroma natural de acuerdo con la Directiva del Consejo de la UE 88/388/EEC y la US FDA 21CFR101.22

50 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. Las actividades inhibidora mínima y 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-aroma compounds with potent antibacterial action that act 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 ug/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.* 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-nonaenal 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). 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 de patente de EE.UU. nº 2007/0087094 sugería el uso de al menos dos compuestos GRAS microbiocidas 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. 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 sugiere un aldehído orgánico de tres 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. Los documentos US 6.387.866, US 6.960.350 y US 7.638.114 sugieren el uso de aceite esencial o terpenos (por ejemplo, trans-2-hexenal) como perfume para productos antimicrobianos. El documento US 6.479.044 describe 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 terpeno. Los documentos US 6.323.171, US 6.121.224 y US 5.911.915 describen microemulsiones con fines antimicrobianos que contienen un tensioactivo catiónico donde se añade un aceite esencial como perfume. Este perfume puede contener diferentes terpenos que incluyen el trans-2-hexenal. El documento US 6.960.350 describe una fragancia antifúngica donde se encontró un efecto sinérgico cuando se usaron diferentes terpenos en combinación (por ejemplo, trans-2-hexenal con benzaldehído).

El modo de acción del trans-2-hexenal se cree que es a través de la alteración de la membrana celular debido a la reacción del trans-2-hexenal con restos sulfhidrilo o restos cisteína, o formación de bases de Schiff con grupos amino de 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. El resto de aldehído α,β -insaturado 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).

5 El trans-2-hexanal es un inhibidor de la fosfolipasa D, una enzima que cataliza la hidrólisis de fosfolípidos de membrana, lo que ocurre durante la maduración y envejecimiento de muchos tipos de frutas y vegetales. Por lo tanto, se sugiere que el trans-2-hexenal puede inhibir el envejecimiento (Solicitud publicada de EE.UU. nº 2005/0031744 A1). 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 se han sugerido como otros 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 otros 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). Otro ha 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 trans-2-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 (US 5.663.152), y potenciadores para antibióticos polimixinas (US 5.776.919 y US 5.587.358). Estos potenciadores pueden incluir indol, anetol, 3-metilindol, ácido 2-hidroxi-6-R-benzoico o trans-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. La exposición humana al trans-2-hexenal es ~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, 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 solubles o acidez valorable de la fruta. En un panel entrenado para pruebas, no se observaron diferencias significativas en la calidad 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).

- Una concentración de 1,8 µg de trans-2-hexenal/ml de aire inhibía la germinación de semillas de soja en casi 100%. El orden de inhibición del crecimiento era trans-2-hexenal > hexenal > trans-2-nonenal cuando se exponían semillas en germinación a vapores saturados de los aldehídos (Gardner, H. W.; Dornbos Jr., D. L.; Desjardins, A. E. "Hexenal, trans-2-Hexenal, and trans-2-Nonenal Inhibit Soybean, *Glycine max*, Seed Germination". *J. Agric. Food Chem.* 1990, v. 38, 1316-1320)
- La técnica anterior no ha sugerido u observado que el uso de trans-2-hexenal en combinación con ácidos orgánicos mejore de forma sinérgica 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.
- 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 (RCOOH = 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 (RCOOH → RCOO⁻ + 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 calcium propionate as fungistats in poultry feed", *Poult. Sci.* v. 58, 572-576).
- El ácido propiónico es un inhibidor de mohos más potente que el ácido acético, valérico, butírico, láctico y benzoico. El ácido propiónico tiene una dosis eficaz entre 0,05 y 0,25%, al contrario que otros ácidos orgánicos que requieran alrededor de 0,5% (Higgins C. y F. Brinkhaus, 1999, "Efficacy of several organic acids against mold," *J. Applied Poultry Res.* v.8, 480-487).
- El maíz forrajero tratado con 0,5% de una mezcla que contiene 80% de ácido propiónico y 20% de ácido acético, no tiene efecto perjudicial en el rendimiento de cerdos destetados (Rahnema, S. y S. M. Neal, 1992, "Preservation and use of chemically treated high-moisture corn by weanling pigs", *J. Prod. Agric.* v. 5, no. 4, 458-461). En pollos de engorde, la adición de ácido acético al 0, 0,1, 0,2, 0,3 y 0,4%, al agua no afectaba al rendimiento o recuentos microbianos intestinales en los pollos de engorde (Akbari, M.R., H. Kermanshani y G.A. Kalidari, 2004, "Effect of acetic acid administration in drinking water on performance growth characteristics and ileal microflora of broiler chickens," *J. Sci. & Technol. Agric. & Natur. Resour.* 8 (3): 148).
- 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).
- 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 (Chadeganipour y Haims, 2001 "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. (Aneja, M., Gianfagna, T. J., y Hebbar, K. P. 2005. "Trichoderma harzianum produces nonanoic acid, an inhibitor of spore germination and mycelial growth of two cacao pathogens". *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 67, 304-307).
- Varias patentes de EE.UU. describen el uso del ácido pelargónico como fungicida y bactericida: la solicitud publicada de EE.UU. n° 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. El documento US 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 consiste en 80% de ácido pelargónico o sus sales para el control de hongos de plantas. Los ácidos grasos usados son principalmente C₉ a C₁₈. El documento US 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. El documento US 5.093.124 describe un fungicida y artropocida para plantas que comprende ácidos alfa-monocarboxílicos y sus sales. Preferiblemente el fungicida contiene ácidos grasos C₉ a C₁₀, parcialmente neutralizados por metales alcalinos activos tales como potasio. La mezcla descrita
 5 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. El documento US 6.596.763 describe un método para controlar infección en la piel usando ácidos grasos C₆ a C₁₈ o sus derivados. Los documentos US 6.103.768 y US 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
 10 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. El documento US 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 a 8 carbonos.

El ácido pelargónico se usa como un componente de una solución desinfectante para superficies de contacto con alimentos en establecimientos de manipulación de alimentos. Un producto de EcoLab que contiene 6,49% de ácido pelargónico como ingrediente activo se puede usar como un desinfectante para todas las superficies de contacto con
 20 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 incluido en la lista de la USDA de Sustancias Autorizadas, 1990, sección 5.14, Compuestos para el lavado de frutas y verduras.

El emulsionante o tensioactivo no iónico etoxilado como el aceite de ricino etoxilado son producidos por la reacción de aceite con óxido de etileno. Los emulsionantes de aceite de ricino etoxilado son de diferentes longitudes de cadena, dependiendo de la cantidad de óxido de etileno usado durante la síntesis. La relación molar puede variar de 1 molécula de aceite de ricino y de 1 a 2000 moléculas de óxido de etileno que produce un emulsionante de aceite de ricino etoxilado llamado también emulsionante de aceite de ricino PEG-x (polietilenglicol), donde "x" es el número de moléculas de óxido de etileno. (Fruijtier-Polloth, Claudia, 2005, "Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products" *Toxicology*, v. 214, 1-38). Estos emulsionantes se han usado ampliamente para solubilizar fármacos insolubles en agua para tratamientos para seres humanos y animales. Son compuestos estables no volátiles, que no se hidrolizan o deterioran durante el almacenamiento. El aceite de ricino se obtiene de las semillas de *Ricinus communis* y consiste principalmente en triglicéridos de ácidos ricinoleico, isoricinoleico, esteárico y dihidroxiesteárico. El aceite de ricino es 90% ácido ricinoleico (ácido 12-hidroxioléico), no tóxico, biodegradable y una fuente renovable.

Se han presentado varias solicitudes PCT sobre los usos de tensioactivos de aceite de ricino etoxilado. El documento WO 99/60865 se refiere a una emulsión de tensioactivo-agua añadida al pienso animal antes o después de tratamiento con calor. Esta patente se refiere a una emulsión que ayuda a mantener o a reducir la pérdida de
 40 agua durante el tratamiento con calor. La emulsión consiste en 1-8 partes de agua y 0,005-0,5 partes de tensioactivo. El documento WO 97/28896 se refiere al uso del tensioactivo para facilitar la dispersión de molasas. El documento WO 96/11585 se refiere al uso de aceite de ricino etoxilado en el pienso animal para mejorar el valor de nutrientes del pienso. El documento WO 95/28091 se refiere a la adición de aceite de ricino etoxilado en el pienso para mejorar la disponibilidad de la sustancia nutritiva en el pienso animal seco convencional con el fin de aumentar el crecimiento animal y disminuir la mortalidad. Estas cuatro patentes mencionan la adición del tensioactivo de aceite de ricino etoxilado, preferiblemente una emulsión, para mejorar la digeribilidad de sustancias hidrófobas presentes en el pienso animal y no muestran ningún beneficio en la producción de pienso o prevención de crecimiento de moho en el pienso.

Los terpenos, que son Generalmente reconocidos como seguros (GRAS), están muy extendidos en la naturaleza, principalmente en plantas como constituyentes de aceites esenciales. Su unidad estructural es el hidrocarburo isopreno (C₅H₈)_n. Los ejemplos de terpenos incluyen citral, pineno, nerol, b-ionona, geraniol, carvacrol, eugenol, carvona, terpeniol, anetol, alcanfor, mentol, limoneno, nerolidol, farnesol, fitol, caroteno, escualeno, timol, tocotrienol, alcohol de perillol, bomeol, mirceno, simeno, careno, terpeneno, linalool y otros. El geraniol, tocotrienol, alcohol de perillol, b-ionona y d-limoneno, suprimen la actividad de la HMG-COA reductasa hepática, una etapa limitante de la velocidad en la síntesis del colesterol, y disminuyen de forma modesta los niveles de colesterol en animales (Elson C. E. y S. G. Yu, 1994, "The Chemoprevention of Cancer by Mevalonate-Derived Constituents of Fruits and Vegetables," *J. Nutr.* v.124, 607-614). El D-limoneno y geraniol reducen tumores mamarios (Elgebede, J. A., C. E. Elson, A. Qureshi, M. A. Tanner y M. N. Gould, 1984, "Inhibition of DMBA-Induced Mammary Cancer by Monoterpene D-limonene," *Carcinogenesis* v.5, no.5, 661-664; Elgebede, J. A., C. E. Elson, A. Qureshi, M. A. Tanner y M. N. Gould, 1986, "Regression of Rat Primary Mammary Tumors Following Dietary D-limonene," *J. Nat'l Cancer Institute* v.76, no. 2, 323-325; Karlson, J., A. K. Borg, R. Unelius, M. C. Shoshan, N. Wilking, U. Ringborg y S. Linder, 1996, "Inhibition of Tumor Cell Growth By Monoterpenes In Vitro: Evidence of a Ras-Independent Mechanism of Action," *Anticancer Drugs* v. 7, no.4, 422-429) y suprimían el crecimiento de tumores trasplantados (Yu, S. G., P. J.

Anderson y C. E. Elson, 1995, "The Efficacy of B-ionone in the Chemoprevention of Rat Mammary Carcinogenesis," *J. Agri. Food Chem.* v. 43, 2144-2147).

También se ha encontrado que los terpenos inhiben el crecimiento in vitro de bacterias y hongos (Chaumont J. P. y D. Leger, 1992, "Campaign Against Allergic Moulds in Dwellings, Inhibitor Properties of Essential Oil Geranium "Bourbon," Citronellol, Geraniol and Citral," *Ann. Pharm. Fr.* v. 50, no.3, 156-166), y algunos parásitos internos y externos (Hooser, S. B., V. R. Beasley y J. J. Everitt, 1986, "Effects of an Insecticidal Dip Containing D-limonene in the Cat", *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v. 189, no.8, 905-908). Se encontró que el geraniol inhibía el crecimiento de cepas de *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* potenciando la velocidad de pérdida de potasio y alterando la fluidez de la membrana (Bard, M., M. R. Albert, N. Gupta, C. J. Guuynn y W. Stillwell, 1988, "Geraniol Interferes with Membrane Functions in Strains of Candida and Saccharomyces", *Lipids* v. 23, no. 6, 534-538). La B-ionona tiene actividad antifúngica que se determinó por inhibición de la germinación de esporas e inhibición del crecimiento en agar (Mikhlin E. D., V. P. Radina, A. A. Dmitrossky, L. P. Blinkova, y L. G. Button, 1983, "Antifungal and Antimicrobial Activity of Some Derivatives of Beta-Ionone and Vitamin A", *Prikl Biokhim Mikrobiol.* v. 19, 795-803; Salt, S. D., S. Tuzun y J. Kuc, 1986, "Effects of B-ionone and Abscisic Acid on the Growth of Tobacco and Resistance to Blue Mold, Mimicry the Effects of Stem Infection by Peronospora Tabacina", *Adam Physiol. Molec. Plant Path* v.28, 287-297). La terpenona (geraniolgeraniolacetona) tiene un efecto antibacteriano en *H. pylori* (Ishii, E., 1993, "Antibacterial Activity of Terpenone, a Non Water-Soluble Antiulcer Agent, Against Helicobacter Pylori", *Int. J. Med. Microbiol. Virol. Parasitol. Infect. Dis.* v.280, no.1-2, 239-243). Disoluciones de 11 terpenos diferentes eran eficaces en la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas en ensayos in vitro (Kim, J., M. Marshall y C. Wei, 1995, "Antibacterial Activity of Some Essential Oil Components Against Five Foodborne Pathogens", *J. Agric. Food Chem.* v.43, 2839-2845). Los diterpenos, es decir, trichorabdol A (de *R. Trichocarpa*), han mostrado un efecto antibacteriano muy fuerte contra *H. pylori* (Kadota, S., P. Basnet, E. Ishii, T. Tamura y T. Namba, 1997, "Antibacterial Activity of Trichorabdol A from Rabdosia Trichocarpa Against Helicobacter Pylori", *Zentralbl. Bakteriol* v.287, no.1 63-67). Owawunmi, 1989 (Evaluation of the Antimicrobial Activity of Citral, *Letters in Applied Microbiology* v. 9, no.3, 105-108), mostró que el medio de crecimiento con más de 0,01% de citral reducía la concentración de *E. coli*, y con 0,08% había un efecto bactericida. La patente de EE.UU. 5.673.468, enseña una formulación de terpenos, basada en aceite de pino, usada como un desinfectante o limpiador antiséptico. La patente de EE.UU. 5.849.956, enseña que un terpeno encontrado en el arroz tiene actividad antifúngica. El documento US 5.939.050 enseña un producto antimicrobiano para la higiene con una combinación de 2 o 3 terpenos que muestran un efecto sinérgico. El documento WO 03/070181 describe una composición para la conservación de alimentos que comprende al menos un terpeno. El documento DD 161131 A1 describe un conservante de piensos, que contiene, basándose en el 2-etilhex-2-en-1-al, ácido propiónico, 2-etilhexano-1-ácido o 2-etilhex-2-en-1-ácido como ingredientes activos adicionales además de los diferentes aditivos usados habitualmente, en donde dichos ingredientes se mezclan en proporciones que están en el intervalo de 5:1 a 1:2 (2-etilhex-2-en-1-al respecto al otro ingrediente activo). El documento JP 2000 325037 A describe una composición obtenida incluyendo al menos una clase de ingrediente de fragancia para alimentos que no tiene efecto inhibitor en la proliferación microbiana, en donde este último ingrediente es al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en diacetilo, timol, trans-2-hexenal, linalool, 1,8-cineol, acetoína, y sus derivados.

Resumen de la invención

Un objeto de la invención es mejorar el efecto microbiano de ácidos orgánicos en el pienso animal incluyendo al menos 10% en peso, basado en el peso total de los ácidos orgánicos, del aldehído trans-2-hexenal. La composición antimicrobiana puede ser una solución acuosa que contiene un ácido orgánico o una mezcla de varios ácidos orgánicos, en combinación con el aldehído.

La composición puede contener además un tensioactivo no iónico etoxilado.

La composición puede contener además terpenos antimicrobianos o aceites esenciales.

Los ácidos orgánicos se seleccionan del grupo que consiste en ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido pelargónico y mezclas de los mismos.

El tensioactivo puede ser un tensioactivo de aceite de ricino etoxilado con un HLB (equilibrio hidrófilo-lipófilo) de 4 a 18. También puede comprender otros tensioactivos no iónicos, iónicos o anfóteros u otro tensioactivo de propiedades similares tales como Tween.

Los terpenos de la composición pueden comprender disulfuro de alilo, timol, citral, eugenol, carvacrol, limoneno y carvona, o mezclas de los mismos.

Además del trans-2-hexenal, la composición puede contener un aldehído volátil que resulta de la ruta de la lipoxigenasa que incluye (2E,6Z)-nonadienal, trans-2-nonenal, y otros aldehídos alifáticos [alfa],[beta]-insaturados, es decir, propenal, trans-2-butenal, 2-metil-2-butenal, 2-metil-(E)-2-butenal, 2-pentenal, 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 y otros aldehídos alifáticos [alfa],[beta]-insaturados, con propiedades antimicrobianas y

saborizantes, así como sus respectivas formas de alcohol y ácido.

Una mezcla de la invención contiene de 1 a 90% en peso de ácidos orgánicos, que se seleccionan del grupo que consiste en ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido pelargónico, y mezclas de los mismos, y de 10 a 55% de trans-2-hexenal.

5 La mezcla puede contener hasta 90% en peso de ácido acético, preferiblemente de 10 a 55% en peso.

La mezcla puede contener hasta 90% en peso de ácido propiónico, preferiblemente de 10 a 55% en peso.

La mezcla puede contener hasta 90% en peso de ácido pelargónico, preferiblemente de 5 a 10% en peso.

La mezcla puede contener hasta 90% en peso de ácido láctico, preferiblemente de 10 a 40% en peso.

La mezcla puede contener de 10 a 55% en peso de trans-2-hexenal, preferiblemente de 10 a 30% en peso.

10 La mezcla puede contener de 0 a 30% en peso de terpenos en volumen, preferiblemente de 0,5 a 7% en peso.

La mezcla puede contener de 0 a 30% en peso de un terpeno antimicrobiano, preferiblemente de 0,5 a 7% en peso.

La mezcla puede contener de 0 a 10% en peso de tensioactivo en volumen, preferiblemente de 0,5 a 10% en peso.

La mezcla puede contener de 0,5 a 10% en peso de tensioactivo de aceite de ricino etoxilado con 1 a 200 moléculas de etileno, preferiblemente de 1 a 5,0% en peso.

15 La mezcla de la invención puede contener de 0,5 a 10% en peso de tensioactivo con propiedades similares a las del tensioactivo de aceite de ricino, preferiblemente de 1 a 5,0% en peso.

La mezcla de la invención puede contener hasta 97% en peso de agua, preferiblemente de 1 a 20% en peso.

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.

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

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

25 Otro objeto de la invención es proporcionar un método de tratamiento del pienso animal, que comprende: mezclar el pienso animal con una cantidad eficaz de una composición antimicrobiana que comprende de 1 a 90% en peso, basado en el peso total, de un ácido orgánico seleccionado del grupo que consiste en ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido pelargónico, y mezclas de los mismos, de 10 a 55% en peso, basado en el peso total de trans-2-hexenal, con la condición de que constituya al menos 5% en peso de la mezcla de aldehídos y ácidos orgánicos, de 0 a 30% en peso basado en el peso total de terpenos, de 0 a 10% en peso basado en el peso total de un tensioactivo, y agua.

30 Descripción de las realizaciones preferidas

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.

35 Un "ácido orgánico" de la composición puede ser 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.

40 Un aldehído alifático α,β -insaturado de la composición puede ser propenal, trans-2-butenal, 2-metil-2-butenal, 2-metil-(E)-2-butenal, trans-2-hexenal, 2-pentenal, 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 y otros aldehídos alifáticos α,β -insaturados con propiedades antimicrobianas y saborizantes, así como sus respectivas formas de alcohol y ácido.

45 Un "terpeno antimicrobiano" de la composición puede comprender disulfuro de alilo, citral, pineno, nerol, geraniol, carvacrol, eugenol, carvona, anetol, alcanfor, mentol, limoneno, farnesol, caroteno, timol, borneol, mirceno, terpeneno, linalool, o mezclas de los mismos. Más específicamente, los terpenos pueden comprender disulfuro de alilo, timol, citral, eugenol, limoneno, carvacrol y carvona, o mezclas de los mismos.

Por la expresión "cantidad eficaz" de un compuesto se entiende 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 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.

- 5 Las formulaciones pueden variar no solo en concentración de los componentes principales, es decir, ácidos orgánicos, sino también en el tipo de aldehídos, terpenos, tensioactivos y concentración de agua usados. Esta invención se puede modificar de diferentes formas añadiendo o eliminando de la formulación el terpeno, tipo de ácido orgánico, aldehído y tipo de tensioactivo.

- 10 Los términos "efecto sinérgico" o "sinergia" significan la mejora del efecto conservante cuando los ingredientes se añaden como una mezcla en lugar de como componentes individuales.

Composición

Una composición de la presente invención comprende una cantidad eficaz de ácidos orgánicos seleccionados del grupo que consiste en ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido pelargónico, y mezclas de los mismos, y trans-2-hexenal.

- 15 Se pueden usar terpenos antimicrobianos, extractos vegetales o aceites esenciales que contienen terpenos así como los terpenos más purificados. Los terpenos están fácilmente disponibles en el mercado o se pueden producir por diferentes métodos conocidos en la técnica, tal como la extracción con disolvente o extracción con vapor/destilación y por síntesis química.

- 20 El tensioactivo es no iónico, incluyendo el tensioactivo de aceite de ricino etoxilado con 1 a 2000 conexiones polietileno, preferiblemente de 20 a 100.

- 25 La composición preferida contiene de 1 a 90% en peso de ácidos orgánicos seleccionados del grupo que consiste en ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido pelargónico, y mezclas de los mismos, y de 10 a 30% de trans-2-hexenal, en donde el ácido orgánico puede ser de 10 a 55% en peso de ácido acético, de 10 a 55% en peso de ácido propiónico, de 10 a 40% en peso de ácido láctico o de 5,0 a 10% en peso de ácido pelargónico, y mezclas de los mismos. La composición preferida también puede contener de 0,5 a 7% en peso de terpenos, de 0,5 a 10% en peso de tensioactivo y de 1,0 a 10% en peso de agua.

Métodos

La presente invención es eficaz contra bacterias y hongos. Se aplica en una forma tal que proporcione una distribución uniforme y homogénea de la mezcla por todo el pienso.

- 30 La presente invención se puede aplicar al agua.

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

La presente invención se puede aplicar a las materias primas no mezcladas en la mezcladora.

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

La presente invención se puede aplicar mediante una boquilla de pulverización.

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

- 40 Había resultados inesperados, es decir, sinergia más allá de los efectos aditivos, cuando se añadió trans-2-hexenal a los ácidos orgánicos y terpenos.

A lo largo de esta descripción se hace referencia a diferentes publicaciones, las cuales se incorporan todas en la presente memoria por referencia en su totalidad en esta solicitud

Ejemplos

- 45 Ejemplos 1 y 2

Procedimiento: Las siguientes formulaciones se prepararon para estudios in vitro por duplicado. Todos los reactivos eran de la mayor pureza y calidad de laboratorio. Para el ácido acético, se preparó una solución al 56%. El ácido succínico se diluyó en agua hasta solución al 5% debido a problemas de solubilidad. Se ensayaron dos productos comerciales, una mezcla de ácido fórmico/propiónico y una mezcla de formaldehído/ácido propiónico, para fines de comparación.

- 50

ES 2 640 964 T3

Formulaciones químicas para los ejemplos 1 y 2												
Producto químico	% de producto químico en la formulación											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Eugenol	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	0
Carvacrol	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	0
CO60*(tensioactivo)	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	0
Ácido pelargónico	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	0
Ácido acético (56%)	22,5	32,5	22,5	22,5	22,5	37,5	22,5	12,5	32,5	12,5	0	0
Ácido láctico	20,0	0	0	0	0	0	0	10,0	40,0	0	0	0
Ácido propiónico	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	50,0	0	40,0	42,5	10,0
Ácido fórmico	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	70,0
Ácido succínico (5%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20,0	30,0	0
Ácido láurico	0	0	0	0	0	0	20,0	0	0	0	0	0
Ácido mirístico	0	0	0	0	0	5,0	0	0	0	0	0	0
Ácido caprílico	0	0	0	0	20,0	0	0	0	0	0	0	0
Ácido levulínico	0	0	0	20,0	0	0	0	0	0	0	0	20,0
trans-2-hexenal	0	10,0	20,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

*CO-60 es tensioactivo de aceite de ricino etoxilado con 60 unidades de etileno.

Se añadió una suspensión de *Salmonella typhimurium* a dos tubos de ensayo que contenían 0,05% (500 ppm) 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.

5

Resultados: La siguiente tabla muestra que varias de las formulaciones eran eficaces en el control del crecimiento de Salmonella.

Resultados: Estudios 1 y 2

Tratamiento	24 H ufc/ml (0,05%)			
	Estudio 1	% de reducción	Estudio 2	% de reducción
Control	1093		1900	
Fórmula 1	0	100,0	37	98,1
Fórmula 2	7	99,4	10	99,5
Fórmula 3	13	98,8	0	100,0
Fórmula 4	33	97,0	130	93,2
Fórmula 5	27	97,5	133	93,0
Fórmula 6	83	92,4	163	91,4
Fórmula 7	143	86,9	240	87,4
Fórmula 8	20	98,2	70	96,3
Fórmula 9	3	99,7	0	100,0
Fórmula 10	147	86,6	160	91,6
Fórmula 11	197	82,0	283	85,1
Fórmula 12	0	100,0	0	100,0
Ácido fórmico/propiónico	0	100,0	0	100,0
Formaldehído (33%)	0	100,0	0	100,0

10 Conclusiones: Las formulaciones produjeron diferentes respuestas contra Salmonella. Las formulaciones con niveles más altos de trans-2-hexenal y ácido láctico funcionaron mejor que todas las demás con excepción de los productos basados en formaldehído y ácido fórmico.

Ejemplo 3

15 Procedimiento: De los estudios in vitro previos, se eligieron seis formulaciones para ensayar su eficacia contra Salmonella en piensos. Se ensayó una mezcla de formaldehído/ácido propiónico con fines de comparación. 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 1, 2 y 3 kg/tm de las formulaciones citadas a continuación. 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. Las formulaciones usadas para este experimento se muestran en la siguiente tabla.

20

Formulaciones químicas para el ejemplo 3	
Producto químico	% de producto químico en la formulación

ES 2 640 964 T3

Fórmulas	1	2	3	8	9	12
Eugenol	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	0
Carvacrol	6,25	6,25	6,25	6,25	6,25	0
CO60*	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	0
Ácido pelargónico	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	0
Ácido acético (56%)	22,50	32,50	22,50	12,50	32,50	0
Ácido láctico	20,00	0	0	10,00	40,00	0
Ácido propiónico	30,00	30,00	30,00	50,00	0	10,00
Ácido fórmico	0	0	0	0	0	70,00
Ácido levulínico	0	0	0	0	0	20,00
trans-2-hexenal	0	10,00	20,00	0	0	0
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

*CO-60 es tensioactivo de aceite de ricino etoxilado con 60 unidades de etileno

Resultados: La siguiente tabla muestra que varias formulaciones eran eficaces en el control del crecimiento de Salmonella.

Tratamiento	Kg/tm	ufc/g	% de reducción
Fórmula 1	0	2540	
	1	2010	21
	2	1730	32
	3	1385	45
Fórmula 2	0	1860	
	1	895	52
	2	583	69
	3	273	85
Fórmula 3	0	2220	
	1	815	63
	2	420	81
	3	80	96
Fórmula 8	0	2080	
	1	1670	20
	2	1540	26
	3	1325	36
Fórmula 9	0	2005	
	1	1313	34
	2	1470	27
	3	1150	43
Fórmula 12	0	2080	
	1	1010	51
	2	230	89
	3	93	96
Formaldehído (33%)	0	1180	
	1	0	100
	2	0	100
	3	0	100

- 5 Conclusiones: Las fórmulas que contienen trans-2-hexenal mostraron mayor eficacia contra Salmonella. Las formulaciones con nivel alto de trans-2-hexenal produjeron eficacias similares comparadas con los productos basados en formaldehído (formaldehído al 33%) y ácido fórmico.

Ejemplo 4

- 10 Procedimiento: Se seleccionaron cinco formulaciones 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 1, 2 y 3 kg/tm de las formulaciones citadas a continuación. 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 y 14 días después de tratamiento para el recuento de Salmonella. Las fórmulas usadas se muestran en la siguiente tabla.
- 15

Formulaciones químicas para el ejemplo 4					
Producto químico	% de producto químico en la formulación				
	16	17	18	19	20
Eugenol	5,00	0,00	0,00	0,50	1,00
Carvacrol	5,00	0,00	0,00	0,50	1,00
CO60*	5,00	0,00	0,00	0,50	1,00
Ácido pelargónico	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Ácido acético (56%)	30,00	45,00	20,00	47,50	53,00
Ácido propiónico	20,00	20,00	50,00	26,00	24,00
Trans-2-hexenal	30,00	30,00	25,00	20,00	15,00
	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

*CO-60 es tensioactivo de aceite de ricino etoxilado con 60 unidades de etileno.

Resultados: La siguiente tabla muestra que varias de las formulaciones eran eficaces para controlar Salmonella.

Efecto de los productos químicos en Salmonella a los 1, 7 y 14 días después de tratamiento							
Fórmula	Tasa de tratamiento	Salmonella a las 24H		Salmonella a los 7 días		Salmonella a los 14 días	
		ufc/g de pienso	% de reducción	ufc/g de pienso	% de reducción	ufc/g de pienso	% de reducción
Fórmula nº 16	0	1,2E+05		1,8E+05		6,4E+04	
	1	2,8E+04	77	2,3E+04	86,9	1,5E+04	77,1
	2	1,2E+04	90	6,3E+03	96,4	4,3E+03	93,2
	3	2,0E+03	98	1,0E+03	99,4	3,3E+02	99,5
Fórmula nº 17	0	1,5E+05		1,5E+05		1,4E+05	
	1	5,0E+04	66	3,5E+04	76,9	3,5E+04	75,8
	2	1,4E+04	91	6,0E+03	96,0	2,3E+03	98,4
	3	3,3E+02	100	3,3E+02	99,8	1,0E+03	99,3
Fórmula nº 18	0	1,3E+05		1,5E+05		1,4E+05	
	1	3,7E+04	72	2,7E+04	82,3	2,5E+04	81,4
	2	7,3E+03	94	1,2E+04	92,1	7,7E+03	94,4
	3	7,3E+03	94	3,3E+03	97,8	6,7E+02	99,5
Fórmula nº 19	0	1,4E+05		1,8E+05		8,2E+04	
	1	5,5E+04	59	7,2E+04	60,8	2,7E+04	66,9
	2	6,3E+03	95	2,0E+04	88,9	1,1E+04	86,5
	3	3,7E+03	97	4,0E+03	97,8	6,3E+03	92,2
Fórmula nº 20	0	1,3E+05		2,0E+05		8,0E+04	
	1	6,5E+04	48	7,5E+04	62,4	4,0E+04	49,8
	2	2,8E+04	77	2,7E+04	86,4	1,2E+04	85,5
	3	9,7E+03	92	1,4E+04	93,2	1,0E+04	87,6

5 Conclusiones: Todas las formulaciones produjeron una reducción en los recuentos de Salmonella en los piensos. Las fórmulas con nivel bajo de trans-2-hexenal (<15%) no fueron tan eficaces como las otras.

10 Ejemplo 5

15 Procedimiento: Las formulaciones nº 17 y nº 18 que contenían trans-2-hexenal se compararon con otras seis formulaciones que contenían menores cantidades de este aldehído pero con mayores niveles de ácido láctico. 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 1, 2 y 3 kg/tm de las formulaciones citadas a continuación. 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 y 14 días después de tratamiento para el recuento de Salmonella. Las fórmulas usadas se muestran en la siguiente tabla.

ES 2 640 964 T3

Formulaciones químicas para el ejemplo 5								
Producto químico	% de producto químico en la formulación							
Fórmulas	17	18	21	22	23	24	25	26
Eugenol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,75	0,00	0,00
Carvacrol	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,75	0,00	0,00
CO-60*	0,00	0,00	0,00	5,00	5,00	5,00	8,00	0,00
Ácido pelargónico	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	0,00
Ácido acético (56%)	45,00	20,00	38,00	40,00	35,00	30,00	36,00	0,00
trans-2-hexenal	30,00	25,00	5,00	5,00	5,00	10,00	10,00	0,00
Ácido propiónico	20,00	50,00	12,00	15,00	10,00	10,00	15,00	10,00
Láctico	0,00	0,00	40,00	30,00	40,00	38,50	26,00	0,00
Ácido fórmico (88%)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	90,00
TOTAL	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

*CO-60 es tensioactivo de aceite de ricino etoxilado con 60 unidades de etileno.

Resultados: La siguiente tabla muestra que varias de las formulaciones eran eficaces para controlar Salmonella.

Efecto de los productos químicos en Salmonella a los 1, 7 y 14 días después de tratamiento							
Tratamientos	Tasa de tratamiento	Salmonella el día 1		Salmonella el día 7		Salmonella el día 14	
	Kg/tm	ufc/g de pienso	% de reducción	ufc/g de pienso	% de reducción	ufc/g de pienso	% de reducción
Fórmula nº 17	0	1,75E+05		1,11E+05		1,07E+04	
	1	3,93E+04	77,52	2,67E+03	97,60	3,33E+03	68,75
	2	1,00E+03	99,43	3,33E+02	99,70	1,00E+03	90,63
	3	6,70E+02	99,62	0,00E+00	100,00	6,67E+02	93,75
Fórmula nº 18	0	1,87E+05		6,77E+04		8,33E+03	
	1	7,07E+04	62,21	1,13E+04	83,25	1,00E+03	88,00
	2	9,67E+03	94,83	4,00E+03	94,09	3,33E+02	96,00
	3	6,00E+03	96,79	6,67E+02	99,01	0,00E+00	100,00
Fórmula nº 21	0	1,17E+05		1,31E+05		1,40E+04	
	1	6,60E+04	43,59	3,40E+04	74,05	7,33E+03	47,62
	2	2,30E+04	80,34	2,30E+04	82,44	3,50E+03	75,00
	3	8,67E+03	92,59	8,67E+03	93,38	1,33E+03	90,48
Fórmula nº 22	0	2,30E+05		2,08E+05		7,00E+03	
	1	1,65E+05	28,41	4,13E+04	80,13	3,33E+03	52,38
	2	6,97E+04	69,71	1,30E+04	93,75	1,50E+03	78,57
	3	2,13E+04	90,72	4,33E+03	97,92	1,00E+03	85,71
Fórmula nº 23	0	1,13E+05		1,66E+05		5,33E+03	
	1	1,01E+05	10,88	7,07E+04	57,52	2,00E+03	62,50
	2	5,95E+04	47,50	2,83E+04	82,97	1,33E+03	75,00
	3	3,00E+04	73,53	5,67E+03	96,59	1,00E+03	81,25
Fórmula nº 24	0	1,75E+05		9,70E+04		5,00E+03	
	1	5,73E+04	67,14	3,70E+04	61,86	1,00E+03	80,00
	2	3,10E+04	82,23	1,27E+04	86,94	1,00E+03	80,00
	3	2,20E+04	87,39	4,00E+03	95,88	6,67E+02	86,67
Fórmula nº 25	0	2,36E+05		8,20E+04		2,27E+04	
	1	1,11E+05	52,97	2,37E+04	71,14	6,67E+03	70,59
	2	9,13E+04	61,30	7,00E+03	91,46	4,00E+03	82,35
	3	4,10E+04	82,63	3,00E+03	96,34	6,67E+02	97,06
Fórmula nº 26	0	1,53E+05		5,15E+04		1,13E+04	
	1	8,40E+04	45,10	1,17E+04	77,35	3,67E+03	67,65
	2	3,37E+04	78,00	6,00E+03	88,35	2,33E+03	79,41
	3	1,53E+04	89,98	6,67E+02	98,71	1,33E+03	88,24

5

Conclusiones: Disminuyendo el nivel de trans-2-hexenal (a 5% - 25%) y aumentando el nivel de ácido láctico (a 26% - 40%), se obtuvo una respuesta similar comparado con niveles altos de trans-2-hexenal (30%).

Ejemplo 6

Procedimiento: Cuatro de siete formulaciones ensayadas del ejemplo 5 demostraron un efecto satisfactorio contra

ES 2 640 964 T3

- 5 *Salmonella typhimurium*. En este estudio se ensayaron una nueva formulación (fórmula 27) y un antimicrobiano basado en formaldehído (formaldehído al 33%). 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 1, 2 y 3 kg/tm de las formulaciones citadas a continuación. 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, 14 y 21 días después de tratamiento para el recuento de *Salmonella*. Las fórmulas usadas se muestran en la siguiente tabla.

Formulaciones químicas para el ejemplo 6						
Producto químico	% de producto químico en la formulación					
Fórmulas	17	18	22	25	27	HCHO
CO60*	0,00	0,00	5,00	8,00	10,00	0,00
Acido pelargónico	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	0,00
Acido acético (56%)	45,00	20,00	40,00	36,00	40,00	0,00
trans-2-hexenal	30,00	25,00	5,00	10,00	5,00	0,00
Acido propiónico	20,00	50,00	15,00	15,00	10,00	10,00
Láctico	0,00	0,00	30,00	26,00	30,00	0,00
Formaldehído (37%)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	90,00
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

*CO-60 es tensioactivo de aceite de ricino etoxilado con 60 unidades de etileno.

- 10 Resultados: La siguiente tabla muestra que varias de las formulaciones eran eficaces para controlar *Salmonella*.

Efecto de los productos químicos en <i>Salmonella</i> a los 1, 7 y 14 días después de tratamiento									
Tratamiento	Tasa	Salmonella a las 24 horas		Salmonella el día 7		Salmonella el día 14		Salmonella el día 21	
Fórmula	Dosis kg/tm	ufc/g	%de reducción	ufc/g	%de reducción	ufc/g	%de reducción	ufc/g	%de reducción
17	0	56408		11969		25889		4150	
	1	14600	74,1	4550	62,0	11400	56,0	1633	60,7
	2	3900	93,1	1400	88,3	4833	81,3	267	93,6
	3	2900	80,1	1150	90,4	1300	95,0	0	100,0
18	0	56408		11969		25889		4150	
	1	18400	67,4	2200	81,6	10533	59,3	1300	68,7
	2	5400	90,4	2900	75,8	5133	80,2	200	95,2
	3	1800	96,8	1317	89,0	1767	93,2	33	99,2
22	0	56408		11969		25889		4150	
	1	43000	23,8	10217	14,6	17667	31,8	2567	38,1
	2	31000	45,0	6450	46,1	15167	41,4	800	80,7
	3	26600	52,8	2133	82,2	11500	55,6	233	94,4
25	0	56408		11969		25889		4150	
	1	19450	65,5	7217	39,7	13233	48,9	1300	68,7
	2	9500	83,2	1967	83,6	9333	63,9	367	91,2
	3	5900	89,5	767	93,6	8867	65,7	450	89,2
27	0	56408		11969		25889		4150	
	1	33000	41,5	10017	16,3	13600	47,5	633	84,7
	2	24150	57,2	9367	21,7	11933	53,9	367	91,2
	3	17150	69,6	4983	58,4	7367	71,5	267	93,6
HCHO*	0	56408		11969		25889			
	1	150	99,7	0	100,0	0	100,0		
	2	150	99,7	0	100,0	0	100,0		
	3	0	100,0	0	100,0	0	100,0		

*Mezcla de formaldehído (33%)/propiónico

Conclusiones: Todas las formulaciones produjeron más de 90% de eficacia 2 o 3 semanas después del tratamiento.

- 15 Ejemplo 7

20 Este experimento era para determinar si la fórmula nº 18 tiene actividad residual después de tratamiento. Pienso de aves de corral comercial se molió con el molino Romer a un tamaño de partículas fino para asegurar el mezclamiento uniforme del inóculo en el pienso. El pienso (submuestras de 1 kg) se transfirió a una jarra de vidrio de 3,8 litros (1 galón) que se asignaron aleatoriamente a tratamientos. El contenido de la jarra de vidrio de 3,8 litros se añadió al mezclador de pienso a escala de laboratorio y se mezcló durante 1-2 minutos, antes del tratamiento con 0,

5 1, 2 o 3 kg/ton de la fórmula nº 18. Había una repetición de la aplicación por nivel de tratamiento. Después del tratamiento, el pienso se volvió a contaminar con 10 g de inóculo de Salmonella y se mezcló 2-3 minutos adicionales. El contenido del mezclador se transfirió a la jarra de vidrio de 3,8 litros original, se tapó y se dejó agitar durante 1 día a temperatura ambiente (23-24°C). Se obtuvieron muestras de piensos (tres submuestras de 10 g/tratamiento) a las 24 horas, 7 y 14 días después de la recontaminación, usando técnicas asépticas. Las submuestras se transfirieron a frascos de dilución que contenían 100 ml de tampón Butterfield. Las diluciones seriadas se cultivaron en 2 placas separadas de agar XLT-4. Las placas de agar se incubaron a 37°C durante 48 horas antes del recuento de Salmonella.

10 El nivel de Salmonella de las tres muestras repetidas/tratamiento en diferentes intervalos de tiempo se promedió y se da en la siguiente tabla.

% Eficacia contra la recontaminación con Salmonella			
Fórmula nº 18 (dosis)	Día 1	Día 7	Día 14
1 kg/tm	63	70	54
2 kg/tm	75	45	87
3 kg/tm	82	73	98

Se observa que la fórmula nº 18 retenía la eficacia 14 días después de haber contaminado el pienso con Salmonella.

15 Será evidente para los expertos en la técnica que se pueden hacer una serie de modificaciones y variaciones en la presente invención sin salirse del alcance de la invención. Se pretende que la memoria descriptiva y los ejemplos se consideren solo ilustrativos y no son restrictivos, estando indicado el verdadero alcance de la invención mediante las siguientes reivindicaciones.

20

REIVINDICACIONES

1. Una composición antimicrobiana que comprende, basado en el peso total,
de 1 a 90% en peso, de uno o una mezcla de ácidos orgánicos, seleccionados del grupo que consiste en ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido pelargónico, y mezclas de los mismos,
- 5 de 10% a 55% en peso de trans-2-hexenal,
de 0 a 30% en peso de terpenos,
de 0 a 10% en peso de tensioactivo,
y
agua.
- 10 2. La composición de la reivindicación 1, que comprende de 0,5 a 7% en peso de terpenos, y de 0,5 a 10% en peso de tensioactivo.
3. La composición de la reivindicación 1, en donde el tensioactivo es tensioactivo de aceite de ricino etoxilado con un HLB (equilibrio hidrófilo-lipófilo) de 4 a 18.
- 15 4. La composición de la reivindicación 1, en donde el tensioactivo es tensioactivo de aceite de ricino etoxilado con 1 a 200 moléculas de etileno.
5. La composición de la reivindicación 1, en donde el terpeno se selecciona del grupo que consiste en disulfuro de alilo, citral, pineno, nerol, geraniol, carvacrol, eugenol, carvona, anetol, alcanfor, mentol, limoneno, farnesol, caroteno, timol, borneol, mirceno, terpeneno, linalool, y mezclas de los mismos.
- 20 6. La composición de la reivindicación 1, que contiene 5% en peso de ácido pelargónico, 11-25% en peso de ácido acético, 20-50% en peso de ácido propiónico y 10-30% en peso de trans-2-hexenal.
7. La composición de la reivindicación 1, que contiene 5% en peso de ácido pelargónico, 11% en peso de ácido acético, 50% en peso de ácido propiónico y 25% en peso de trans-2-hexenal.
8. La composición de la reivindicación 1, en donde la composición contiene de 10 a 55% en peso de ácido acético, de 10 a 55% en peso de ácido propiónico o de 5 a 10% en peso de ácido pelargónico.
- 25 9. Un método de tratamiento de pienso animal, que comprende:
mezclar el pienso animal con una cantidad eficaz de una composición antimicrobiana según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.