



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

| | |
|--------------------|-----------------|
| DOMANDA NUMERO | 102007901547602 |
| Data Deposito | 03/08/2007 |
| Data Pubblicazione | 03/02/2009 |

| Sezione | Classe | Sottoclasse | Gruppo | Sottogruppo |
|---------|--------|-------------|--------|-------------|
| A | 23 | K | | |

Titolo

COMPOSIZIONE SINERGICA COMPREDENTE SOSTANZE AROMATIZZANTI ED ACIDI ORGANICI, E RELATIVO USO.

DESCRIZIONE

Annessa a domanda di brevetto per INVENZIONE INDUSTRIALE avente per titolo: "**COMPOSIZIONE SINERGICA COMPRENDENTE SOSTANZE AROMATIZZANTI ED ACIDI ORGANICI, E RELATIVO USO**"

5 A nome: VETAGRO S.R.L. società di nazionalità italiana con sede a REGGIO EMILIA

Mandatari: Ing. Giuseppe Righetti iscritto all'Albo con il n. 7 BM, Ing. Carlo Raoul Ghioni iscritto all'Albo con il n. 280 BM, Ing. Martino Salvadori iscritto all'Albo con il n. 438 BM, Dott. Carlo Bottero
10 iscritto all'Albo con il n. 560 BM, Fabrizio Tansini iscritto all'Albo con il n. 697 BM, Ing. Gianmarco Ponzellini iscritto all'Albo con il n. 901 BM, Dott. Roberto Margutti iscritto all'Albo con il n. 938 B, Ing. Matteo Baroni iscritto all'Albo con il n. 1064 BM, Dott. Marco Benedetto iscritto all'Albo con il n.
15 1089 B, Ing. Marco Brasca iscritto all'Albo con il n. 1094 BM e Ing. Luigi Tarabbia iscritto all'Albo con il n. 1005 BM, Ing. Marco Sgobba iscritto all'Albo con il n. 1206 della BUGNION S.p.A. domiciliati presso quest'ultima in MILANO - Viale Lancetti 17.

20 Depositato il: al n.:

* * * * *

La presente invenzione si riferisce ad una composizione comprendente una miscela sinergica consistente di aromi o sostanze aromatizzanti ed acidi organici. Inoltre, la presente invenzione si riferisce all'uso di detta composizione
25 come conservante per alimenti e additivi animali destinati preferibilmente ad

animali monogastrici.

E' noto che il valore del pH nell'apparato gastrico di animali monogastrici è acido. Il valore del pH varia in base al specifico tratto dell'apparato gastro-intestinale. Ad esempio, lo stomaco presenta un pH compreso tra 2 e 5, il duodeno presenta un pH compreso da 4 a 6, il digiuno presenta un pH compreso da 6 a 7, il cieco un pH compreso da 6 e 6,5 ed infine il colon un pH compreso da 6,5 a 7.

Detto ambiente acido svolge, nel sistema gastro-intestinale, un effetto protettivo contro la proliferazioni di patogeni.

E' noto, tuttavia, che alcuni organismi patogeni sono in grado di sviluppare un complesso sistema di difesa che permette, alle cellule dei patogeni stessi, di sopravvivere agli abbassamenti di pH fino a valori di 3.

Inoltre, alcuni batteri, come ad esempio la *Salmonella typhimurium*, possono sviluppare un sistema in grado di tollerare gli acidi a pH 3 dopo una precedente esposizione ad un acido debole a pH 5.

In EP1391155 viene descritta una composizione comprendente acidi organici ed agenti aromatizzanti. La composizione viene utilizzata per prevenire le infezioni di patogeni nel tratto gastro-intestinale in animali monogastrici.

Tuttavia, rimane vivo l'interesse per sviluppare nuove composizioni in grado di prevenire o controllare le infezioni, dovute alla presenza e/o alla proliferazione di patogeni, nel tratto gastro-intestinale. In particolare, è importante sviluppare composizioni aventi una efficacia antibatterica migliorata.

A tale scopo la Richiedente propone una composizione avente le caratteristiche come riportate nella unita rivendicazione indipendente.

Forme preferite dell'invenzione sono in accordo alle caratteristiche come

riportate nelle unite rivendicazioni dipendenti.

Nel contesto della presente invenzione, per composizione si intende una composizione in forma solida per esempio una composizione in granuli o una composizione in polvere.

- 5 Nel contesto della presente invenzione si applica la direttiva 88/388/CEE del Consiglio del 22 giugno 1988 sul ravvicinamento delle legislazioni degli Stati Membri nel settore degli aromi destinati ad essere impiegati nei prodotti alimentari e nei materiali di base per la loro preparazione (pubblicata in Italia nella Gazzetta ufficiale n. L 184 del 15/07/1988). La presente direttiva si applica
- 10 agli « aromi », impiegati o destinati ad essere impiegati nei o sui prodotti alimentari per conferire loro odore e/o gusto, ed ai materiali di base utilizzati per la loro produzione. Pertanto, nel contesto della presente invenzione, si intende per:
- a) « aroma », le sostanze aromatizzanti, le preparazioni aromatiche, gli
- 15 aromatizzanti di trasformazione, gli aromatizzanti di affumicatura o loro miscele;
- b) « sostanza aromatizzante », una determinata sostanza chimica dotata di proprietà aromatizzanti e
- i) ottenuta con opportuni procedimenti fisici (comprese la distillazione e
- 20 l'estrazione con solventi) oppure con procedimenti enzimatici o microbiologici a partire da una materia di origine vegetale o animale allo stato naturale o previa trasformazione per il consumo umano con procedimenti tradizionali di preparazione di prodotti alimentari (comprese l'essiccazione, la torrefazione e la fermentazione);
- 25 ii) ottenuta per sintesi chimica o isolata a mezzo di procedimenti chimici e

chimicamente identica ad una sostanza naturalmente presente in un prodotto di origine vegetale o animale descritto al punto i);

iii) ottenuta per sintesi chimica, ma non identica chimicamente ad una sostanza naturalmente presente in una materia di origine vegetale o animale descritto al punto i);

c) « preparazione aromatica », un prodotto diverso dalle sostanze definite alla lettera b), punto i), concentrato o meno, avente proprietà aromatizzanti ed ottenuto con opportuni procedimenti fisici (comprese la distillazione e l'estrazione con solventi), oppure con procedimenti enzimatici o microbiologici a partire da materie di origine vegetale o animale allo stato naturale o previa trasformazione per il consumo umano con procedimenti tradizionali per la preparazione di prodotti alimentari (comprese l'essiccazione, la torrefazione e la fermentazione);

d) « aromatizzante di trasformazione », un prodotto ottenuto, rispettando la prassi corretta di fabbricazione, mediante riscaldamento per non più di 15 minuti a temperatura non superiore a 180 °C di una miscela di ingredienti che non hanno necessariamente di per sé proprietà aromatizzanti e di cui almeno uno contiene azoto (amino) e un altro è uno zucchero riduttore;

e) « aromatizzante di affumicatura », un estratto di fumi impiegato nei procedimenti tradizionali di affumicatura degli alimenti.

Gli aromi possono contenere prodotti alimentari ed altre sostanze.

La composizione oggetto della presente invenzione comprendente una miscela consistente di almeno una sostanza definita come ai sopra citati punti a), b), c), d), e) in combinazione con almeno un acido organico.

In una realizzazione detta sostanza può essere ad esempio un aroma o una

sostanza aromatizzante, senza alcuna limitazione. Detta sostanza è scelta dal gruppo consistente di timolo, vanillina, carvacrolo, cinnamaldeide, acido ottanoico, acido eptanoico, diallile disolfuro, canfora, limonene, acido rosmarinico, p-cimene, γ -terpinene, α -pinene, α -tujone, 1,8-cineolo.

5 Ad esempio, il p-cimene è presente in *Thymus vulgaris* e *Origanum vulgare*; il g-terpinene è presente in *Thymus vulgaris* e *Origanum vulgare*; l' α -tujone è presente in *Salvia officinalis*; l' α -pinene è presente in *Rosmarinus officinalis* e *Salvia officinalis*; il 1,8-cineolo è presente in *Rosmarinus officinalis* e *Salvia officinalis*.

10 L'acido organico è scelto dal gruppo consistente di acido lattico, malico, benzoico, fumarico e sorbico o un loro sale. Nel contesto della presente invenzione l'acido organico può essere presente in forma salificata, ad esempio con un metallo alcalino o alcalino terroso.

In una realizzazione preferita, la composizione comprende inoltre acido citrico o
15 un citrato di un metallo alcalino o alcalino terroso.

Ad esempio, la composizione può essere rappresentata da acido citrico, acido sorbico e timolo.

La miscela può essere in forma solida o in forma liquida, ad esempio in soluzione acquosa.

20 Nella miscela della presente invenzione il rapporto molare tra detta almeno una sostanza definita come ai sopra citati punti a), b), c), d), e) e detto almeno un acido organico è compreso da 1:500 a 500:1, preferibilmente da 1:300 a 300:1, ancor più preferibilmente da 1:200 a 200:1. Vantaggiosamente il rapporto molare è compreso da 1:150 a 150:1, per esempio da 1:100 a 100:1.

25 La composizione e/o la miscela della presente invenzione possono contenere

inoltre altri componenti nutrizionali utili e fisiologicamente accettabili per gli animali.

La miscela in forma liquida, ad esempio in soluzione acquosa, può avere un pH compreso da 6,5 a 7,5. La miscela può essere resa in forma solida mediante un processo di cristallizzazione noto nell'arte.

In una realizzazione preferita, la miscela è costituita da almeno due aromi o sostanze aromatizzanti scelte dal gruppo consistente di timolo, vanillina, carvacrolo, cinnamaldeide, acido ottanoico, acido eptanoico, diallile disolfuro, canfora, limonene, acido rosmarinico, p-cimene, γ -terpinene, α -pinene, α -tugione, 1,8-cineolo e da almeno due acidi organici scelti dal gruppo consistente di acido lattico, acido malico, acido benzoico, acido fumarico e acido sorbico.

Preferibilmente, la miscela è costituita da tre aromi o sostanze aromatizzanti e da almeno tre acidi organici. Ancor più preferibilmente, la miscela è costituita da quattro aromi o sostanze aromatizzanti e da almeno quattro acidi organici.

In una realizzazione preferita, la miscela è costituita da carvacrolo e da almeno un acido organico scelto dal gruppo consistente di acido citrico, acido lattico, acido malico, acido benzoico, acido fumarico e acido sorbico. Preferibilmente, la miscela è costituita da carvacrolo e da almeno due acidi organici; ancor più preferibilmente da tre acidi organici.

In una realizzazione preferita, la miscela è costituita da timolo e da almeno un acido organico scelto dal gruppo consistente di acido lattico, acido malico, acido benzoico, acido fumarico e acido sorbico. Preferibilmente, la miscela è costituita da timolo e da almeno due acidi organici; ancor più preferibilmente da tre acidi organici.

In una realizzazione preferita, la miscela è costituita da cinnamaldeide e da

- almeno un acido organico scelto dal gruppo consistente di acido citrico, acido lattico, acido malico, acido benzoico, acido fumarico e acido sorbico. Preferibilmente, la miscela è costituita da cinnamaldeide e da almeno due acidi organici; ancor più preferibilmente da tre acidi organici.
- 5 In una realizzazione preferita, la miscela è costituita da vanillina e da almeno un acido organico scelto dal gruppo consistente di acido citrico, acido lattico, acido malico, acido benzoico, acido fumarico e acido sorbico. Preferibilmente, la miscela è costituita da vanillina e da almeno due acidi organici; ancor più preferibilmente da tre acidi organici.
- 10 In una realizzazione preferita, la miscela è costituita da canfora e da almeno un acido organico scelto dal gruppo consistente di acido citrico, acido lattico, acido malico, acido benzoico, acido fumarico e acido sorbico. Preferibilmente, la miscela è costituita da canfora e da almeno due acidi organici; ancor più preferibilmente da tre acidi organici.
- 15 In una realizzazione preferita, la miscela è costituita da acido eptanoico e da almeno un acido organico scelto dal gruppo consistente di acido citrico, acido lattico, acido malico, acido benzoico, acido fumarico e acido sorbico. Preferibilmente, la miscela è costituita da acido eptanoico e da almeno due acidi organici; ancor più preferibilmente da tre acidi organici.
- 20 In una realizzazione preferita, la miscela è costituita da acido ottanoico e da almeno un acido organico scelto dal gruppo consistente di acido citrico, acido lattico, acido malico, acido benzoico, acido fumarico e acido sorbico. Preferibilmente, la miscela è costituita da acido ottanoico e da almeno due acidi organici; ancor più preferibilmente da tre acidi organici.
- 25 In una realizzazione preferita, la miscela è costituita da limonene e da almeno un

- acido organico scelto dal gruppo consistente di acido citrico, acido lattico, acido malico, acido benzoico, acido fumarico e acido sorbico. Preferibilmente, la miscela è costituita da limonene e da almeno due acidi organici; ancor più preferibilmente da tre acidi organici.
- 5 In una realizzazione preferita, la miscela è costituita da diallile disolfuro e da almeno un acido organico scelto dal gruppo consistente di acido citrico, acido lattico, acido malico, acido benzoico, acido fumarico e acido sorbico. Preferibilmente, la miscela è costituita da diallile disolfuro e da almeno due acidi organici; ancor più preferibilmente da tre acidi organici.
- 10 In una realizzazione preferita, la miscela è costituita da acido rosmarinico e da almeno un acido organico scelto dal gruppo consistente di acido citrico, acido lattico, acido malico, acido benzoico, acido fumarico e acido sorbico. Preferibilmente, la miscela è costituita da acido rosmarinico e da almeno due acidi organici; ancor più preferibilmente da tre acidi organici.
- 15 In una realizzazione preferita, la miscela è costituita da α -pinene e da almeno un acido organico scelto dal gruppo consistente di acido citrico, acido lattico, acido malico, acido benzoico, acido fumarico e acido sorbico. Preferibilmente, la miscela è costituita da α -pinene e da almeno due acidi organici; ancor più preferibilmente da tre acidi organici.
- 20 In una realizzazione preferita, la miscela è costituita da α -tugione e da almeno un acido organico scelto dal gruppo consistente di acido citrico, acido lattico, acido malico, acido benzoico, acido fumarico e acido sorbico. Preferibilmente, la miscela è costituita da α -tugione e da almeno due acidi organici; ancor più preferibilmente da tre acidi organici.
- 25 In una realizzazione preferita, la miscela è costituita da cineolo e da almeno un

acido organico scelto dal gruppo consistente di acido citrico, acido lattico, acido malico, acido benzoico, acido fumarico e acido sorbico. Preferibilmente, la miscela è costituita da cineolo e da almeno due acidi organici; ancor più preferibilmente da tre acidi organici.

- 5 In una realizzazione preferita, la miscela è costituita da γ -terpinene e da almeno un acido organico scelto dal gruppo consistente di acido citrico, acido lattico, acido malico, acido benzoico, acido fumarico e acido sorbico. Preferibilmente, la miscela è costituita da γ -terpinene e da almeno due acidi organici; ancor più preferibilmente da tre acidi organici.
- 10 In una realizzazione preferita, la miscela è costituita da p-cimene e da almeno un acido organico scelto dal gruppo consistente di acido citrico, acido lattico, acido malico, acido benzoico, acido fumarico e acido sorbico. Preferibilmente, la miscela è costituita da p-cimene e da almeno due acidi organici; ancor più preferibilmente da tre acidi organici.
- 15 In una realizzazione preferita, la miscela è costituita da almeno un aroma o sostanza aromatizzante scelta dal gruppo consistente di timolo, vanillina, carvacrolo, cinnamaldeide, acido ottanoico, acido eptanoico, diallile disolfuro, canfora, limonene, acido rosmarinico, p-cimene, γ -terpinene, α -pinene, α -tugione, 1,8-cineolo e da acido citrico. Preferibilmente, la miscela è costituita da
- 20 due aromi o sostanze aromatizzanti e acido citrico; ancor più preferibilmente da tre aromi o sostanze aromatizzanti.

- In una realizzazione preferita, la miscela è costituita da almeno un aroma o sostanza aromatizzante scelta dal gruppo consistente di timolo, vanillina, carvacrolo, cinnamaldeide, acido ottanoico, acido eptanoico, diallile disolfuro,
- 25 canfora, limonene, acido rosmarinico, p-cimene, γ -terpinene, α -pinene, α -

tugione, 1,8-cineolo e da acido lattico. Preferibilmente, la miscela è costituita da due aromi o sostanze aromatizzanti e acido lattico; ancor più preferibilmente da tre aromi o sostanze aromatizzanti.

5 In una realizzazione preferita, la miscela è costituita da almeno un aroma o sostanza aromatizzante scelta dal gruppo consistente di timolo, vanillina, carvacrolo, cinnamaldeide, acido ottanoico, acido eptanoico, diallile disolfuro, canfora, limonene, acido rosmarinico, p-cimene, γ -terpinene, α -pinene, α -tugione, 1,8-cineolo e da acido malico. Preferibilmente, la miscela è costituita da due aromi o sostanze aromatizzanti e acido malico; ancor più preferibilmente da
10 tre aromi o sostanze aromatizzanti.

In una realizzazione preferita, la miscela è costituita da almeno un aroma o sostanza aromatizzante scelta dal gruppo consistente di timolo, vanillina, carvacrolo, cinnamaldeide, acido ottanoico, acido eptanoico, diallile disolfuro, canfora, limonene, acido rosmarinico, p-cimene, γ -terpinene, α -pinene, α -
15 tugione, 1,8-cineolo e da acido benzoico. Preferibilmente, la miscela è costituita da due aromi o sostanze aromatizzanti e acido benzoico; ancor più preferibilmente da tre aromi o sostanze aromatizzanti.

In una realizzazione preferita, la miscela è costituita da almeno un aroma o sostanza aromatizzante scelta dal gruppo consistente di timolo, vanillina, carvacrolo, cinnamaldeide, acido ottanoico, acido eptanoico, diallile disolfuro, canfora, limonene, acido rosmarinico, p-cimene, γ -terpinene, α -pinene, α -
20 tugione, 1,8-cineolo e da acido fumarico. Preferibilmente, la miscela è costituita da due aromi o sostanze aromatizzanti e acido fumarico; ancor più preferibilmente da tre aromi o sostanze aromatizzanti.

25 In una realizzazione preferita, la miscela è costituita da almeno un aroma o

sostanza aromatizzante scelta dal gruppo consistente di timolo, vanillina, carvacrolo, cinnamaldeide, acido ottanoico, acido eptanoico, diallile disolfuro, canfora, limonene, acido rosmarinico, p-cimene, γ -terpinene, α -pinene, α -tugione, 1,8-cineolo e da acido sorbico. Preferibilmente, la miscela è costituita da due aromi o sostanze aromatizzanti e acido sorbico; ancor più preferibilmente da tre aromi o sostanze aromatizzanti.

Vantaggiosamente, il rapporto molare tra detto almeno un aroma o sostanza aromatizzante e detto almeno un acido organico è compreso da 1:300 a 1:5 per acido malico o acido lattico rispettivamente; preferibilmente da 1:100 a 1:10.

10 Vantaggiosamente, il rapporto molare tra detto almeno un aroma o sostanza aromatizzante e detto almeno un acido organico è compreso da 1:250 a 1:5 per acido benzoico o acido citrico rispettivamente; preferibilmente da 1:100 a 1:10.

Vantaggiosamente, il rapporto molare tra detto almeno un aroma o sostanza aromatizzante e detto almeno un acido organico è compreso da 1:250 a 1:5 per acido fumarico; preferibilmente da 1:125 e 1:10.

Vantaggiosamente, il rapporto molare tra detto almeno un aroma o sostanza aromatizzante e detto almeno un acido organico è compreso da 1:100 a 1:5 per acido sorbico; preferibilmente da 1:50 a 1:10.

Vantaggiosamente, la miscela costituita da timolo, carvacrolo e cinnamaldeide svolge un notevole effetto antibatterico e consente di ridurre considerevolmente/eliminare i patogeni presenti dopo solo 24 ore.

Forma oggetto della presente invenzione una composizione comprendente una miscela, come sopra descritta, la quale è rivestita da uno strato di un agente veicolante. Detto agente veicolante è scelto tra quelli in grado di veicolare e rilasciare, nel tratto gastro-intestinale, i componenti di detta miscela. Il rilascio

nelle diverse porzioni del tratto gastro-intestinale è in funzione del tempo, della temperatura, del pH, della flora batterica e microorganismi in esso presenti.

Preferibilmente, la miscela oggetto dell'invenzione presenta un rivestimento esterno il quale è costituito due strati distinti. Il rivestimento è in grado di
5 rilasciare i componenti presenti nella miscela in funzione del tempo, della temperatura, del pH, della flora batterica e microorganismi presenti nelle diverse porzioni del tratto gastro-intestinale.

La miscela può essere rivestita da uno strato o da due strati mediante tecniche note e conosciute dall'esperto del settore.

10 Alternativamente, l'agente veicolante può essere mescolato con detto almeno un aroma o sostanza aromatizzante e detto almeno un acido organico. La miscelazione dei componenti può essere realizzata mediante tecniche note e conosciute dall'esperto del settore.

Un esempio di un procedimento prevede che in un contenitore munito di mezzi
15 di riscaldamento e mezzi di mescolamento venga inserito l'agente veicolante, ad esempio un trigliceride vegetale. Successivamente, la temperatura del contenitore viene portata ad una temperatura compresa da 80 a 120°C, mantenendo la matrice in agitazione, sino a quando l'agente veicolante è allo stato fuso. Opzionalmente, alla matrice fusa vengono successivamente
20 addizionati gli additivi. L'agitazione e la temperatura vengono mantenuti fino ad ottenere una massa dell'agente veicolante con una distribuzione omogenea di additivi in essa. Eventualmente, a questo stadio si può procedere all'addizione degli emulsionanti a detta massa.

La composizione rivestita o non rivestita può essere resa in forma granulare
25 mediante le tecniche note e conosciute dall'esperto del settore.

L'agente veicolante può comprendere una sostanza lipidica in grado di modulare un lento rilascio dei componenti della miscela.

E' importante che i componenti della miscela siano rilasciati gradualmente nelle diverse porzioni del tratto gastro-intestinale. Un rilascio graduale e specifico
5 nelle diverse porzioni del tratto gastro-intestinale consente di migliorare l'attività antibatterica della composizione oggetto della presente invenzione in quanto si ha una migliore sinergia tra i componenti della miscela.

La sostanza lipidica è scelta tra i trigliceridi idrogenati e/o non idrogenati. I trigliceridi sono scelti tra quelli di origine vegetale e/o animale.

10 I trigliceridi vegetali idrogenati sono scelti dal gruppo: olio di palma, olio di girasole, olio di mais, olio di colza, olio di arachide ed olio di soia.

I trigliceridi di origine animale sono scelti tra: sego bovino e strutto suino.

Preferibilmente, la composizione può comprendere l'agente veicolante in una quantità compresa da 40 a 70 % in peso e la miscela, secondo l'invenzione, in
15 una quantità compresa da 1-50% in peso, rispetto al peso totale della composizione.

La matrice può inoltre comprendere particolari additivi. Gli additivi sono scelti dal gruppo: silice pirogenica (fumed silica), calcio stearato, magnesio stearato, calcio solfato. Gli additivi impiegati consentono di aumentare la viscosità della
20 matrice stessa e di ridurre la sua permeabilità. Preferibilmente, l'agente veicolante può comprendere alcuni additivi da 0,1 a 30 % in peso rispetto al peso totale dell'agente veicolante; ad esempio da 1 a 20 %.

La composizione dell'invenzione trova impiego nella profilassi e/o trattamento di infezioni batteriche. Nel contesto della presente invenzione, per infezioni
25 batteriche, si intende tutte le situazioni ove la presenza e/o crescita di organismi

procarioti hanno un effetto deleterio per l'ospite, come ad esempio causare una patologia.

Tra detti organismi procarioti vengono citati quelli appartenenti alle specie: *Salmonella sp.*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E.coli*, *K. Pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P.*
5 *aeruginosa*, *C. perfringens*, *Cambylobacter sp.*, *S. pneumoniae*, *B. cereus*, *C.*
albicans, *A. oryzae*, *P. funiculosum* e *F. moniliforme*.

In una realizzazione più preferita detti organismi procariota sono *C. perfringens* e *Salmonella typhimurium*.

In un'altra realizzazione preferita, detta miscela è usata per la preparazione di un
10 medicamento per la profilassi e/o trattamento di infezioni batteriche che include
inoltre un agente veicolante. In una realizzazione ancora più preferita, detto
agente veicolante è una matrice lipidica come sopra descritto. Il medicamento in
detta realizzazione può essere usato per la profilassi e/o trattamento di infezioni
batteriche nel sistema gastro-intestinale di animali monogastrici.

15 La composizione oggetto della presente invenzione trova applicazione come
conservante per alimenti e additivi animali.

Parte sperimentale

Esempio 1 – Valutazione dell'attività antimicrobica svolta da acidi organici e
aromi o sostanze aromatizzanti nei confronti del *Clostridium perfringens* dopo
20 24 ore di incubazione in piatti di microtitolazione mediante metodo di densità
ottica.

In pratica si è determinato il potere antibatterico delle miscele, oggetto della
presente invenzione, mediante un metodo di diluizione e misure di densità ottica
(Smith-Palmer et al.; 1998).

25 La concentrazione minima di inibizione (MIC) di una sostanza o miscela può

essere definita come la concentrazione minima di tale sostanza o miscela che inibisce la crescita di organismi utilizzati ad una determinata dose di infezione dopo un certo tempo (Karapinar nad Aktug, 1987; Onawunmi, 1989; Hammer et al., 1999; Delaquis et al., 2002).

- 5 Il *C. perfringens* è stato conservato in Cooked Meat a temperatura ambiente, coltivato per inoculazione in un brodo di coltura (Oxoid) contenente RCM (Reinforced Clostridial Medium) e incubato a 37°C per 24 ore in condizioni di anaerobiosi.

10 Prima di essere utilizzati, gli strains del batterio *C. perfringens* conservati sono stati coltivati due volte mediante un'incubazione di 24 ore ciascuna.

Sono state testati i seguenti aromi o sostanze aromatizzanti: timolo (thymol), vanillina (vanillin), carvacrolo (carvacrol), cinnamaldeide (cinnamaldehyde), acido eptanoico (heptanoic acid), acido ottanoico (octanoic acid), canfora (camphor), limonene (limonene), diallile disolfuro (diallyl disulfide), acido 15 rosmarinico (rosmarinic acid), α -pinene (α -pinene), α -tugione (α -thujone), cineolo (cineole), γ -terpinene (γ -terpinene) e p-cimene (p-cymene).

Sono state testati i seguenti acidi organici: acido citrico (citric acid), acido sorbico (sorbic acid), acido malico (malic acid), acido fumarico (fumaric acid), acido benzoico (benzoic acid) e acido lattico (lactic acid).

20 Le soluzioni di riferimento (stock solutions) di ciascuna delle sostanze sopra riportate (aromi/sostanze aromatizzanti e acidi organici) sono state preparate mediante dissoluzione delle sostanze stesse in acqua deionizzata. Il pH della soluzione è stato corretto ad un valore di 6,5 e, successivamente, la soluzione è stata sottoposta ad una filtrazione sterile (diametro dei pori 0,22 μ m).

25 Le soluzioni di lavoro contenenti l'acido organico sono state preparate mediante

una doppia diluizione seriale di ciascuna soluzione di riferimento (stock solution) con un brodo di coltura come sopra preparato a pH 6,5 allo scopo di ottenere le concentrazioni più basse da essere testate in funzione del tipo di acido.

5 Le soluzioni di riferimento degli aromi (flavours stock solutions) sono state ottenute mediante diluizione delle stesse in alcol etilico (75%) allo scopo di raggiungere 7,28 mM, ma le soluzioni di riferimento (stock solutions) per vanillina, limonene e canfora sono state ottenute usando acqua deionizzata.

10 Il pH di tutte le soluzioni è stato aggiustato ad un valore di circa 6,5. Tutte le soluzioni sono state sterilizzate mediante filtrazione utilizzando pori di diametro di 0,22 µm.

15 Le soluzioni di lavoro contenenti il brodo di coltura e gli aromi o sostanze aromatizzanti sono state preparate mediante diluizione di queste ultime con il brodo di coltura RMC a pH 6,5 (soluzione di riferimento contenente aromi o sostanze aromatizzanti: brodo di coltura RMC=3:1). Le altre concentrazioni, sino ad un valore di 1,96 mM, sono state ottenute nello stesso modo.

20 L'inibizione del *Clostridium perfringens* è stata valutata ad una concentrazione di 1×10^4 CFU/pozzetto. Ciascuno dei 96 pozzetti è stato riempito con 100 µl di inoculo batterico (1×10^5 CFU/ml) e con 100 µl di ciascuna soluzione. I pozzetti di controllo negativo sono stati inoculati nello stesso modo con 100 µl di coltura (1×10^5 CFU/ml) e 100 µl di brodo di coltura (pH 6,5) senza l'aggiunta di nessuna sostanza (acido organico o sostanza aromatizzante). Ciascuna sostanza è stata testata due volte per piastra.

25 Le piastre di *Clostridium perfringens* sono state incubate a 37°C in condizioni anaerobiche.

La torbidità delle colture è stata utilizzata come indicatore della crescita batterica ed è stata valutata mediante misure di assorbanza a 630 nm (Tecan Spectra Classic). L'assorbanza è stata misurata dopo un'incubazione di 24 ore.

Risultati

5 L'analisi dei grafici che riporta la crescita del *Clostridium perfringens*, determinata mediante misure di assorbanza, mostra un'attività antibatterica migliorata/incrementata per le miscele sotto riportate rispetto all'attività di ciascun acido organico o sostanza aromatizzante considerata da sola.

10 Le miscele che mostrano un effetto sinergico, tra l'acido organico e la sostanza aromatizzante utilizzata rispetto all'acido organico considerato da solo o la sostanza aromatizzante considerata da sola, sono sotto riportate:

15

1. carvacrolo 0.98-0.49 + acido citrico 31.25-7.82
2. carvacrolo 0.98-0.49 + acido sorbico 50-3.13
3. carvacrolo 0.98-0.49 + acido malico 125-15.63
4. carvacrolo 0.98 + acido fumarico 62.5-7.82
- 20 5. carvacrolo 0.98 + acido benzoico 62.5-31.25
6. carvacrolo 0.98-0.73 + acido lattico 125-62.5
7. timolo 1.46-0.49 + acido citrico 31.25-15.63
8. timolo 0.98 + acido sorbico 25-6.25
- 25 9. timolo 0.98-0.73 + acido malico 125-31.25

10. timolo 1.82-0.98 + acido fumarico 125-31.25
11. timolo 0.98-0.73 + acido benzoico 62.5-15.63
12. timolo 0.98 + acido lattico 500
- 5 13. cinnamaldeide 0.98-0.49 + acido citrico 15.63-7.82
14. cinnamaldeide 1.46-0.49 + acido sorbico 50-3.13
15. cinnamaldeide 0.49 + acido malico 62.5-15.63
16. cinnamaldeide 0.98 + acido fumarico 62.5-15.63
17. cinnamaldeide 0.98-0.73 + acido benzoico 31.25-7.62
- 10 18. cinnamaldeide 1.46-0.98 + acido lattico 125-62.5
19. vanillina 1.82-0.49 + acido citrico 31.25
20. vanillina 1.82-0.98 + acido sorbico 50-25
21. vanillina 1.46 + acido malico 125
- 15 22. vanillina 1.82-0.73 + acido fumarico 31.25-3.91
23. vanillina 0.73-0.49 + acido benzoico 62.5
24. vanillina 1.82-0.98 + acido lattico 500-250
25. canfora 0.98-0.49 + acido citrico 31.25
- 20 26. canfora 0.98 + acido sorbico 25
27. canfora 1.46 + acido malico 250
28. canfora 1.82 to 1.46 + acido fumarico 125-62.5
29. canfora 1.82 + acido benzoico 62.5
30. canfora 1.82 to 0.98 + acido lattico 500

31. acido eptanoico 1.82-0.49 + acido citrico 31.25-7.82
32. acido eptanoico 1.82-0.73 + acido sorbico 50-3.13
33. acido eptanoico 1.82-0.73 + acido benzoico 62.5-7,82
34. acido eptanoico 1.82-0.73 + acido lattico 250-31.25
- 5
35. acido ottanoico 1.82-0.49 + acido citrico 31.25
36. acido ottanoico 1.82-0.49 + acido sorbico 50
37. acido ottanoico 1.82-1.46 + acido malico 250
38. acido ottanoico 0.73 + acido fumarico 7.82
- 10 39. acido ottanoico 1.82-0.73 + acido benzoico 62.5
40. acido ottanoico 1.82 + acido lattico 250
41. limonene 1.82-0.73 + acido citrico 31.25
42. limonene 1.82-0.98 + acido sorbico 50
- 15 43. limonene 1.82-0.49 + acido malico 250
44. limonene 1.82-1.46 + acido benzoico 62.5
45. limonene 1.82 + acido lattico 500
46. diallile disolfuro 1.82-0.49 + acido citrico 31.25-7.82
- 20 47. diallile disolfuro 1.82-0.73 + acido sorbico 50-3.13
48. diallile disolfuro 1.82-0.98 + acido malico 250-62.5
49. diallile disolfuro 1.82-0.98 + acido benzoico 62.5-15.63
50. diallile disolfuro 1.82-0.73 + acido lattico 500-15.63
- 25 51. acido rosmarinico 0.98 + acido citrico 31.25

52. acido rosmarinico 1.46+ acido sorbico 12.5
53. acido rosmarinico 0.98 + acido malico 62.5
54. acido rosmarinico 1.82-0.98 + acido fumarico 62.5
55. acido rosmarinico 1.82-0.73 + acido benzoico 15.63
- 5 56. acido rosmarinico 1.82-0.49 + acido lattico 125-62.5
-
57. α - pinene 1.46-0.73 + acido citrico 31.25-7.82
58. α - pinene 0.98-0.73 + acido sorbico 50-1.56
59. α - pinene 1.46-0.49 + acido malico 250-15.63
- 10 60. α - pinene 1.46-0.49 + acido fumarico 125-3.91
61. α - pinene 1.46-0.49 + acido benzoico 62.5-7.82
62. α - pinene 1.46-0.49 + acido lattico 500-15.63
-
63. α - tugione 1.82-0.73 + acido citrico 31.25-7.82
- 15 64. α - tugione 1.82-0.49 + acido sorbico 50-3.13
65. α - tugione 1.82-0.73 + acido malico 250-15.63
66. α - tugione 1.82-0.98 + acido fumarico 125-3.91
67. α - tugione 1.46-0.49 + acido benzoico 62.5-15.63
68. α - tugione 1.46-0.49 + acido lattico 500-31.25
- 20
69. cineolo 1.82-0.98 + acido citrico 31.25-7.82
70. cineolo 1.82-0.73 + acido sorbico 50-1.56
71. cineolo 1.82-0.98 + acido malico 250-15.63
72. cineolo 1.82-1.46 + acido fumarico 62.5-7.82
- 25 73. cineolo 1.82-0.49 + acido benzoico 62.5-7.82

74. cineolo 1.82-0.73 + acido lattico 250-7.82
75. γ - terpinene 1.82-0.49 + acido sorbico 50-6.25
76. γ - terpinene 1.82-1.46 + acido malico 250-62.5
- 5 77. γ - terpinene 1.82-0.49 + acido benzoico 62.5-7.82
78. γ - terpinene 1.82-0.73 + acido lattico 500-15.63
79. p-cimene 1.82-0.49 + acido sorbico 50-12.5
80. p-cimene 1.82-0.49 + acido benzoico 62.5-7.82
- 10 81. p-cimene 1.82-0.49 + acido lattico 500-15.63

RIVENDICAZIONI

1. Una composizione comprendente una miscela costituita da:
- almeno una molecola aromatizzante scelta dal gruppo consistente di timolo, vanillina, carvacrolo, cinnamaldeide, acido ottanoico, acido eptanoico, dialille
- 5 disolfuro, canfora, limonene, acido rosmarinico, p-cimene, γ -terpinene, α -pinene, α -tujone, 1,8-cineolo; ed
- almeno un acido organico scelto dal gruppo consistente di acido lattico, acido malico, acido benzoico, acido fumarico e acido sorbico o un loro sale di un metallo alcalino o alcalino terroso.
- 10 2. La composizione secondo la rivendicazione 1, in cui è inoltre presente acido citrico o un citrato di un sale alcalino o alcalino terroso.
3. La composizione secondo la rivendicazione 1 e 2, in cui detta
- 15 composizione comprende timolo, acido sorbico o un suo sale con un metallo alcalino o alcalino terroso e acido citrico o un suo sale con un metallo alcalino o alcalino terroso.
4. La composizione secondo una o più delle rivendicazioni 1-3, in cui la sostanza aromatizzante è scelta dal gruppo che consiste di timolo, carvacrolo e cinnamaldeide.
5. La composizione secondo una o più delle rivendicazioni 1-4, in cui il
- 20 rapporto molare tra detto almeno un aroma o sostanza aromatizzante e detto almeno un acido organico o un loro sale di un metallo alcalino o alcalino terroso è compreso da 1:500 a 500:1, preferibilmente da 1:300 a 300:1, ancor più preferibilmente da 1:200 a 200:1.
- 25 6. La composizione secondo la rivendicazione 5, in cui il rapporto molare è compreso da 1:150 a 150:1, preferibilmente da 1:100 a 100:1.

7. La composizione secondo la rivendicazione 5 e 6, in cui il rapporto molare è compreso da 1:300 a 1:5 per acido malico o acido lattico rispettivamente; preferibilmente da 1:100 a 1:10.
8. La composizione secondo la rivendicazione 5 e 6, in cui il rapporto molare è compreso da 1:250 a 1:5 per acido benzoico o acido citrico rispettivamente; preferibilmente da 1:100 a 1:10.
9. La composizione secondo la rivendicazione 5 e 6, in cui il rapporto molare è compreso da 1:250 a 1:5 per acido fumarico; preferibilmente da 1:125 a 1:10.
10. La composizione secondo la rivendicazione 5 e 6, in cui il rapporto molare è compreso da 1:100 a 1:5 per acido sorbico; preferibilmente da 1:50 a 1:10.
11. La composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-10, in cui detta composizione comprende un agente veicolante.
12. La composizione secondo la rivendicazione 11, in cui l'agente veicolante comprende trigliceridi idrogenati e/o non idrogenati di origine animale e/o vegetale.
13. Metodo per preparare una composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-12, in cui è prevista almeno una fase nella quale l'aroma e l'acido organico sono addizionati all'agente veicolante allo stato fuso.
14. Uso di una composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-12 per ridurre o contrastare lo sviluppo e/o la proliferazione di batteri e funghi patogeni nei mangimi e/o nelle premiscele destinate all'alimentazione di animali monogastrici.

15. Uso di una composizione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-12 per la preparazione di un alimento destinato all'impiego zootecnico e veterinario per ridurre o contrastare lo sviluppo e/o la proliferazione di batteri e funghi patogeni nell'apparato gastro-resistente degli animali.

5 p.i.: VETAGRO S.R.L.

IL MANDATARIO
Dott. Roberto Margutti
Iscritto all'Albo con il n. 938B

