(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 386 474**

(21) Número de solicitud: 201130070

(51) Int. CI.:

A23K 1/00 (2006.01)
A61K 31/19 (2006.01)
A61K 31/232 (2006.01)
A61K 36/67 (2006.01)
A61K 36/9068 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN B1

(22) Fecha de presentación:

21.01.2011

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

21.08.2012

Fecha de la concesión:

27.06.2013

(45) Fecha de publicación de la concesión:

09.07.2013

(73) Titular/es:

NOREL, SA (100.0%)
C/ JESÚS APRENDIZ, 19
28007 MADRID (Madrid) ES

(72) Inventor/es:

PABLOS PÉREZ, Enrique

(74) Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

(54) Título: **ADITIVOS PARA ALIMENTACIÓN ANIMAL.**

(57) Resumen:

Aditivos para alimentación animal.

En la presente invención se describe la combinación de sales de ácidos orgánicos con al menos un principio activo de origen vegetal, preferentemente aceites esenciales y parcialmente protegida con grasas y/o aceites vegetales, que evitan que dichos principios activos sean digeridos por las enzimas estomacales en el proceso digestivo. Son preferidas las sales sódicas de un ácido de cadena corta, preferentemente de ácido butírico. Los aceites esenciales preferidos son jengibre, piperina, orégano, ajo, timol, carvacrol, cinamaldehído y/o cualquiera de sus combinaciones. La combinación de las sales de ácidos orgánicos junto con aceites esenciales y protegidas con grasas y/o aceites vegetales son utilizadas como potentes promotores o estimulantes del crecimiento animal, como bactericidas orgánicos frente a bacterias patógenas presentes en dichos animales y como moduladores de su respuesta inmune.

ES 2 386 474 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

ADITIVOS PARA ALIMENTACIÓN ANIMAL.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a aditivos para la alimentación animal a base de sales de ácidos orgánicos combinadas con productos activos de origen vegetal y todo ello recubierto con grasas y/o aceites vegetales. Dichas sales de ácidos orgánicos son utilizadas como promotores o estimulantes del crecimiento animal, moduladores de la respuesta inmune y bactericidas. Por tanto, la presente invención se engloba dentro del campo de la producción animal y más específicamente dentro de los campos de la alimentación y de la salud animal.

ESTADO DE LA TÉCNICA

La tendencia en la alimentación animal en Europa en los últimos años es la búsqueda de una dieta que no sólo cubra las necesidades alimenticias de los animales, sino que además refuerce su estado sanitario y reduzca los problemas patológicos sin utilizar medicamentos, para así conseguir mejorar su producción y los rendimientos económicos del ganadero. Una de las vías de control del estado sanitario y de la inmunidad del animal es por medio del control de la flora intestinal.

La utilización de aditivos ha sido una práctica habitual en la alimentación animal con el fin de mejorar el rendimiento productivo, mejorar la salud así como para lograr un aprovechamiento más eficiente de los alimentos. Debido a la prohibición del uso de antibióticos como sustancias promotoras del crecimiento en la Unión Europea (Directiva 1831/2003/CEE) se han buscado aditivos que, en muchos casos demuestran una mejora productiva respecto incluso a los propios antibióticos (Dipeolu *et al.*, 2005). Diferentes estudios realizados en los últimos años han puesto de manifiesto que los ácidos orgánicos son una buena alternativa. Su modo de acción radica, por un lado, en la reducción de pH a nivel estomacal lo que limita el desarrollo de patógenos y ayuda en la digestión de proteínas y, por otro lado, en la habilidad que algunos de éstos ácidos orgánicos tienen de entrar en las bacterias y bloquear su metabolismo. En este sentido, el ácido butírico, también llamado ácido butanoico, se viene estudiando desde hace varios años, observándose efectos beneficiosos en varias especies: cerdos, aves, rumiantes, etc., incluso en peces. Junto con el ácido acético y el propiónico, el butírico pertenece al grupo de Ácidos Grasos Volátiles (AGV) de cadena corta. Esta demostrado que los AGV de cadena corta pueden inhibir el crecimiento del grupo de bacterias Enterobacteriaceae (Salmonella,

Escherichia coli, etc.) (Van Immerseel et al. 2004). Esta inhibición se da gracias a que la forma no disociada de los ácidos grasos volátiles es capaz de atravesar la membrana de las bacterias, interferir en su metabolismo y producirle la muerte. Por otro lado, el anión del ácido interfiere con la transcripción genética de las bacterias, lo que impide que las mismas se puedan reproducir y causar una infección. El ácido butírico tiene mejor coeficiente de difusión que otros AGV, provocando que atraviese la pared bacteriana con mayor facilidad que otros ácidos.

Junto al efecto antibacteriano, el ácido butírico presenta efectos adicionales que lo hacen único: por ejemplo, estimula la secreción pancreática (Katoh y Tsudo, 1984; Sano et al, 1995), mejora la absorción de electrolitos, reduce la incidencia de diarrea, aumenta la regeneración intestinal de las microvellosidades, junto con un aumento en la longitud de las mismas (Galfi y Bokori 1990, Lesson et al. 2005), a la vez que también incrementa el área de absorción intestinal dando lugar a un mayor peso promedio de las aves y a una mejor conversión del alimento. Así, todos estos estudios, ponen de manifiesto que el ácido butírico es beneficioso para el ganado, tanto a nivel nutricional, como a nivel de salubridad.

Cabe destacar que la forma libre del ácido butírico es difícil de manejar por su alta corrosividad y volatilidad. Para solucionar dicho problema se han desarrollado diferentes presentaciones del mismo: sales del ácido butírico, sales del ácido butírico microencapsuladas y sales de ácido butírico en forma protegida con una matriz de grasas y/o aceites vegetales, que protegen parte del ingrediente activo y consiguen la liberación lenta de este promotor natural del crecimiento, asegurándose así su acción potenciadora del crecimiento y bactericida en todo el tracto digestivo del animal, a la vez que proporcionan la mayor concentración protegida posible, para incluir el producto en el rango de promotor natural del crecimiento de liberación lenta. Esta sal de ácido en forma protegida es comercializada con el nombre de Gustor BP-70 (Norel, SA, España), a partir de aquí y a lo largo de toda la invención lo llamaremos BP-70.

La protección parcial de las sales del ácido butírico con los aceites y/o grasas vegetales permite que el butirato sódico actúe eficazmente a lo largo de todo el tracto digestivo del animal, asegurándose la llegada del principio activo desde los tramos iniciales del digestivo hasta las secciones más distales de dicho tracto gastrointestinal, actuando no sólo como promotor natural del crecimiento, sino también como modulador de la respuesta inmune y como bactericida, reduciendo la posibilidad de infección por parte de bacterias patógenas.

La efectividad de Gustor BP-70 se demuestra a niveles donde las sales del ácido butírico no protegido no actúan (ciego/heces) y a niveles donde dichas sales, en forma encapsulada, aún no han podido actuar (buche), siendo un producto completo y eficaz en la lucha contra infecciones bacterianas, específicamente contra *Salmonella enteriditis,* en la nutrición de aves (Fernández-Rubio C et al, 2009).

El uso como bactericida del butirato sódico ha sido principalmente utilizado en el tratamiento de *Salmonella enteritis*, ya que es una de las principales bacterias patógenas que afectan a los animales y al hombre. Dentro de las bacterias patógenas también se encuentra la bacteria *Clostridium perfringens*, que como consecuencia de la producción de diferentes toxinas causa la enteritis necrótica, resultando en una necrosis extensiva de la mucosa intestinal, afectando principalmente a pollos, pavos, patos y aves silvestres. *C. perfringens* habita de forma natural en el intestino, proliferando bajo determinadas circunstancias, como por ejemplo, exceso de nutrientes no degradados ni digestibles que aparecen con más frecuencia en los cambios de dieta, especialmente cuando el animal recibe dietas mal balanceadas o con materias primas de mala calidad, mala respuesta inmune del tejido linfoide asociado al intestino (GALT) debido al excesivo desgaste del epitelio intestinal como consecuencia de la molienda de los alimentos, presencia de micotoxinas, coccidiosis, etc, desequilibrios en la flora microbiana intestinal, entre otros. En 1972, con la salida al mercado del coccidiostato Monensina pareció detenerse la aparición de casos por infecciones de *C. perfringens* pero con la tendencia de la eliminación de los antibióticos como promotores de crecimiento y de coccidiostatos adicionados al pienso, está apareciendo de nuevo una casuística creciente de dicha enfermedad infecciosa.

Por tanto, para solventar el creciente problema del incremento de enfermedades infecciosas en animales de engorde, utilizados para alimentación humana, y además potenciar en dichos animales el crecimiento de los mismos, la presente invención ha desarrollado un nuevo aditivo para alimentación animal que comprende sales de ácidos orgánicos, preferentemente, ácido butírico, junto con productos activos de origen natural, preferentemente, aceites esenciales, todo ello parcialmente recubierto con grasas y/o aceites vegetales. Dicho aditivo es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano, especialmente de bacterias Gram + y coccidios, además de mejorar el estado del epitelio intestinal e incrementar el peso de los animales tratados. El recubrimiento parcial de los principios activos que forman dicho aditivo alimenticio para animales: la sal de un ácido orgánico y los aceites esenciales; con las grasas y/o aceites de origen vegetal, protege a dichos

principios activos de la digestión estomacal, pero permitiéndoles que sean activos a lo largo de todo el tracto gastrointestinal de los animales, ya que mediante dicho recubrimiento parcial de los principios activos, se consiguen fases del producto con diferentes cantidades de grasa (0%-50% de grasa) que serán digeridas y por tanto liberadas en diferentes puntos del tracto gastrointestinal del animal: la parte no protegida con la grasa se liberará y ejercerá su efecto en las primeras fases del tracto gastrointestinal, hasta la altura del intestino delgado; en cambio, la parte protegida con la grasa no se liberará hasta que ésta se empiece a digerir por acción de las lipasas pancreáticas. Dada la lenta digestión de la grasa, estudios *in-vitro* han demostrado que parte del principio activo puede llegar a las partes más distales del tracto gastrointestinal, ejerciendo también allí su acción.

Por otro lado, el aditivo para alimentación descrito en la presente invención, es también capaz de potenciar el desarrollo del epitelio intestinal, favoreciendo el crecimiento de villis intestinales, que como consecuencia de la enteritis necrótica inducida en los animales descritos en los ejemplos de la presente invención, dichas villis están disminuidas en número y tamaño. Además, el incremento del desarrollo del epitelio intestinal favorece la mejor absorción de los alimentos produciendo así un incremento en el crecimiento y engorde de los animales tratados con el mismo. El aditivo para alimentación descrito en la presente invención también es capaz de disminuir la incidencia de enfermedades bacterianas como pueden ser la enteritis necrótica o las causadas por la *Salmonella enteriditis*, gracias a su acción moduladora de la respuesta inmune y a su acción bactericida frente a los patógenos del tipo *C. perfringens y S. enterica*, entre otros. El uso conjunto de la sal del ácido orgánico junto con aceites esenciales vegetales y todo ello parcialmente recubierto con grasas y/o aceites vegetales es capaz de potenciar el efecto promotor fisiológico del butirato, por ejemplo, como se ha comentado previamente, en el desarrollo de villis intestinales, además de potenciar su efecto bactericida.

El otro principio activo preferido como ingrediente de la combinación con las sales de ácidos orgánicos son los aceites esenciales. Las sinergias de los aceites esenciales con las sales de ácidos orgánicos que destacan, son, desde el punto de vista nutricional, su acción como estimuladores de la digestibilidad, por favorecer el equilibrio y control de la flora microbiana, también destaca por su acción como estimuladores de la inmunidad y por sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes.

Además, en la presente invención se describe el uso de la combinación de dichas sales de ácidos orgánicos junto con aceites esenciales ambos protegidos con aceites y/o grasas de origen animal, como aditivo para piensos animales actuando como un promotor natural del crecimiento además de como bactericida e inmunomodulador, siendo capaz de reducir los niveles de bacterias patógenas, específicamente de *C. perfringes A y S. enterica* y de mejorar la respuesta inmune con la que los animales se protegen de infecciones bacterianas.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Breve descripción de la invención

En la presente invención se describe un nuevo aditivo para alimentación animal que actúa como promotor natural del crecimiento animal y que comprende sales de ácidos orgánicos combinadas con productos activos de origen natural, preferentemente aceites esenciales. Dicha combinación está parcialmente protegida de la digestión estomacal mediante una envuelta parcial de grasas y/o aceites vegetales. Dicha envuelta, al ser parcial, no impide la acción, a lo largo de todo el tracto intestinal, incluso hasta las partes más distales del mismo, de los principios activos mencionados.

Se denominan promotores o estimulantes del crecimiento a los aditivos que forman parte integral de la dieta animal y que cumplen con la función de mejorar el aumento de peso diario de los animales (GDP), así como la conversión de la ración consumida. En la presente invención, los promotores o estimulantes del crecimiento pueden ser administrados de diferentes maneras, ya sean inyectados, en implantes o como un aditivo en el alimento o piensos de los animales. En la presente invención, el efecto sobre el crecimiento se mide como incremento de peso.

A los efectos de la presente invención, el término ácido orgánico se refiere a compuestos que contienen en su fórmula uno o más grupos carboxílicos (-COOH), generadores de protones, que pueden tener además diferentes grupos funcionales tales como hidroxiácidos, cetoácidos, ácidos aromáticos, compuestos heterocíclicos, así como amidas y lactonas. Los ácidos orgánicos utilizados en la presente invención son preferentemente ácidos grasos volátiles, preferentemente de cadena corta y entre los que se pueden seleccionar: ácido butírico, ácido propiónico, ácido fórmico, ácido láctico, ácido cítrico, ácido láurico, ácido cúprico, ácido caprílico, ácido caproico, ácido acético, entre otros. Las proporciones en las

que se encuentra el ácido orgánico en el aditivo para alimentación animal descrito en la presente invención, suelen variar entre un 30 y un 70% en peso de producto total húmedo, siendo la proporción preferida de un 50%.

Las sales de los ácidos orgánicos utilizadas en la presente invención son preferentemente sal sódica, sal cúprica, sal potásica, sal cálcica, entre otras. Las proporciones en las que se encuentra la sal del ácido orgánico en el aditivo para alimentación animal descrito en la presente invención, suele variar entre un 30 y un 70% en peso del producto total húmedo, siendo la proporción preferida de un 60%.

En la presente invención se utiliza preferentemente la sal sódica del ácido butírico (butirato sódico), aunque puede ser utilizada cualquiera de las sales de los ácidos descritos previamente.

A los efectos de la presente invención, el término principio activo de origen vegetal se refiere a toda materia de origen vegetal a la que se le atribuye una actividad apropiada capaz de ejercer un efecto beneficioso sobre el organismo al que se le aplica. Los productos activos de origen vegetal utilizados en la presente invención son preferentemente, aceites esenciales. A los efectos de la presente invención, el término aceite esencial se refiere a una sustancia o sustancias orgánicas volátiles, pertenecientes a diferentes clases de compuestos, por ejemplo, hidrocarburos, ésteres, alcoholes, aldehídos, algunos ácidos, fenoles y sus derivados, lactonas, etc.; todos, productos de largas cadenas, de biosíntesis vegetal, llamados metabolitos secundarios de las plantas. El término aceite esencial se aplica también a las sustancias sintéticas similares, preparadas a partir del alquitrán de hulla, y a las sustancias semi-sintéticas preparadas a partir de los aceites naturales esenciales. Los aceites esenciales utilizados en la presente invención, pueden seleccionarse de entre cualquiera de los de la siguiente lista: jengibre, piperina, orégano, ajo, timol, carvacrol, cinamaldehído, etc. Las proporciones en las que se encuentran los principios activos de origen vegetal en el aditivo para alimentación animal descrito en la presente invención, suelen variar entre el 1 y el 20% en peso de producto total húmedo, siendo la proporción preferida de un 10% en el producto final.

A los efectos de la presente invención, el término grasa y/o aceite vegetal se refiere a un compuesto orgánico obtenido a partir de semillas u otras partes de las plantas en cuyos tejidos se acumula como fuente de energía. Las grasas y/o aceites, vegetales, utilizados en

la presente invención para recubrir la combinación de la sal de ácido orgánico y los productos activos de origen natural, preferentemente, aceites esenciales, pueden seleccionarse de entre otros: estearina de palma (parte más sólida obtenida después del fraccionamiento del aceite de palma) o jabón cálcico de ácidos grasos de aceite de palma (PFAD) (saponificación con calcio de los ácidos grasos). Las proporciones en las que se encuentran dichas grasas y/o aceites vegetales recubriendo la sal del ácido orgánico y los aceites esenciales, descritos en la presente invención, suelen variar entre un 30-60% del peso de producto total húmedo, siendo la proporción preferida de un 30%.

Además, en la presente invención se describe el uso de dicho aditivo, promotor natural del crecimiento animal, además de para la mejora de los parámetros productivos de los animales (por ejemplo incremento del peso de los mismos), como modulador de la respuesta inmune y como bactericida, siendo capaz de disminuir la incidencia de enfermedades bacterianas en dichos animales, como por ejemplo la enteritis necrótica en aves, aunque puede ser utilizado para otro tipo de enfermedades bacterianas como por ejemplo: *Salmonella enteritis, Escherichia coli, Campylobacter* spp., etc y en otros animales, como por ejemplo: conejos, cerdos, etc.

A los efectos de la presente invención, se define el término bactericida como cualquier producto, agente o sustancia capaz de eliminar o matar bacterias. A los efectos de la presente invención, el efecto o la acción bactericida se mide como los cambios macroscópicos producidos en el intestino de los animales debidos a la infección bacteriana. También, a los efectos de la presente invención, la modulación de la respuesta inmune se mide como la variación de la expresión génica, con respecto a animales control sin recibir el aditivo de la invención en su alimentación, infectados o no, de genes que codifican para citocinas, preferentemente, IL-1β, IL-2, CD3δγ y TNFSF15.

Descripción de las figuras

Figura 1. Peso de los animales de los grupos A=control y B=BP-70+Jengibre y piperina en el día 17 del ensayo experimental. En el eje Y se indica el peso expresado en gramos. En el eje X se indica el tiempo expresado en días. *indica las diferencias significativas estadísticamente respecto al grupo control infectado pero no tratado ($p<0.05$). BP-70: butirato de sodio (60% peso húmedo) protegido con grasa vegetal (30% peso húmedo). El porcentaje de jengibre y piperina incluido en el aditivo es un de 5% del peso del producto

total húmedo de cada uno dichos aceites esenciales, es decir 5% de jengibre y 5% de piperina.

Figura 2. Peso de los animales de los grupos A=control y B=BP-70+Jengibre y piperina en el día 24 del ensayo experimental. En el eje Y se indica el peso expresado en gramos. En el eje X se indica el tiempo expresado en días. *indica las diferencias significativas estadísticamente respecto al grupo control infectado pero no tratado ($p<0.05$). BP-70: butirato de sodio (60% peso húmedo) protegido con grasa vegetal (30% peso húmedo). El porcentaje de jengibre y piperina incluido en el aditivo es un de 5% del peso del producto total húmedo de cada uno dichos aceites esenciales, es decir 5% de jengibre y 5% de piperina.

Figura 3. Comparación de los cambios macroscópicos en muestras de intestino sufridos por el grupo de animales tratados con los aditivos BP-70+Jengibre y piperina (Grupo B) respecto a los cambios macroscópicos que presentaba el grupo de animales control infectados pero no tratados (Grupo A). En el eje Y se indica la puntuación de los cambios macroscópicos de cada grupo. *indica las diferencias significativas estadísticamente respecto al grupo control ($p<0.05$). BP-70: butirato de sodio (60% peso húmedo) protegido con grasa vegetal (30% peso húmedo). El porcentaje de jengibre y piperina incluido en el aditivo es un de 10% total del peso del producto húmedo, es decir 5% de jengibre y 5% de piperina.

Figura 4. Niveles relativos de la expresión (Eje Y) de los genes IL-1β, IL-2, IL-8, IL-10, CD3γδ, LITAF y RNFSF15 en los grupos de animales tratados con BP-70 o BP-70+Jengibre y piperina respecto al grupo de animales no infectados y no tratados (Grupo A). BP-70: butirato de sodio (70% peso húmedo) protegido con grasa vegetal (30% peso húmedo). BP-70+Jengibre + piperina: butirato de sodio (60% peso húmedo) protegido con grasa vegetal (30% peso húmedo) + 5% jengibre + 5% piperina. El área cuadrada de la caja abarca el 50% de todas las mediciones, la línea horizontal del interior de la caja representa la mediana de la muestra y las líneas verticales representan el 50% de las mediciones que se salen fuera de los valores de la caja. Los asteriscos indican la significación estadística con un valor de $p<0.05$. Los niveles de expresión relativos de los genes analizados indican la expresión en tanto por 1 de cada gen con respecto a los niveles de expresión de cada gen en el Grupo A.

La **Figura 4A** muestra los niveles relativos de expresión de los genes indicados en el Grupo C (animales no infectados y tratados con BP-70) vs Grupo A (animales no infectados y no tratados).

La **Figura 4B** muestra los niveles relativos de expresión de los genes indicados en el Grupo D (animales no infectados y tratados con BP-70+Jengibre+piperina) vs Grupo A (animales no infectados y no tratados).

La **Figura 4C** muestra los niveles relativos de expresión de los genes indicados en el Grupo F (animales infectados y tratados con BP-70+Jengibre+piperina) vs Grupo A (animales no infectados y no tratados).

Figura 5. Nivel relativo de la expresión (Eje Y) del gen TNFSF15 en los diferentes grupos de tratamiento: BP-70 (Grupos C y E) o BP-70+Jengibre + piperina (Grupos D y F), en comparación con los animales no tratados y no infectados (Grupo A). BP-70: butirato de sodio (70% peso húmedo) protegido con grasa vegetal (30% peso húmedo). BP-70+Jengibre + piperina: butirato de sodio (60% peso húmedo) protegido con grasa vegetal (30% peso húmedo) + 5% jengibre + 5% piperina. Grupo B: animales infectados pero no tratados; Grupo C: animales no infectados y tratados con BP-70; Grupo D: animales no infectaos y tratados con BP-70+Jengibre+piperina; Grupo E: animales infectados y tratados con BP-70; Grupo F: animales infectados y tratados con BP-70+Jengibre+piperina. El área cuadrada de la caja abarca el 50% de todas las mediciones, la línea horizontal del interior de la caja representa la mediana de la muestra y las líneas verticales representan el 50% de las mediciones que se salen fuera de los valores de la caja. Los asteriscos indican la significación estadística con un valor de $p < 0.05$. Los niveles de expresión relativos de los genes analizados indican la expresión en tanto por 1 de cada gen con respecto a los niveles de expresión de cada gen en el Grupo A.

Figura 6. Niveles relativos de expresión (Eje Y) de los genes IL-1β, IL-2, IL-8, IL-10, CD3γδ, LITAF y RNFSF15 en el grupo de animales infectados y tratados con BP-70+Jengibre+piperina (Grupo F), en comparación con los animales no tratados e infectados (Grupo B). BP-70+Jengibre y piperina: butirato de sodio (60% peso húmedo) protegido con grasa vegetal (30% peso húmedo) + 5% jengibre + 5% piperina. El área cuadrada de la caja abarca el 50% de todas las mediciones, la línea horizontal del interior de la caja representa la mediana de la muestra y las líneas verticales representan el 50% de las mediciones que se salen fuera de los valores de la caja. Los asteriscos indican la significación estadística con un valor de $p < 0.05$. Los niveles de expresión relativos de los genes analizados indican la expresión en tanto por 1 de cada gen con respecto a los niveles de expresión de cada gen en el Grupo B.

Figura 7. Niveles relativos de expresión (Eje Y) del gen TNFSF15 en los grupos de animales infectados y tratados con BP-70 (Grupo E) o con BP-70+Jengibre + piperina (Grupo F), en comparación con los animales no tratados e infectados (Grupo B). BP-70:

butirato de sodio (70% peso húmedo) protegido con grasa vegetal (30% peso húmedo). BP-70+Jengibre + piperina: butirato de sodio (60% peso húmedo) protegido con grasa vegetal (30% peso húmedo) + 5% jengibre + 5% piperina. El área cuadrada de la caja abarca el 50% de todas las mediciones, la línea horizontal del interior de la caja representa la mediana de la muestra y las líneas verticales representan el 50% de las mediciones que se salen fuera de los valores de la caja. Los asteriscos indican la significación estadística con un valor de $p < 0.05$. Los niveles de expresión relativos de los genes analizados indican la expresión en tanto por 1 de cada gen con respecto a los niveles de expresión de cada gen en el Grupo B

Descripción detallada de la invención

Uno de los objetos de la presente invención se refiere a aditivos para alimentación animal que comprenden la combinación de sales de ácidos orgánicos con al menos un principio activo de origen vegetal, todo ello parcialmente recubierto con aceites y/o grasas vegetales.

En una realización preferida, los aditivos de la invención se caracterizan porque los ácidos orgánicos se seleccionan de entre cualquiera de la lista: butírico, láctico, cítrico, láurico, cúprico, caprílico, caproico, acético, entre otros, siendo preferido el ácido butírico.

En otra realización preferida, los aditivos de la invención, se caracterizan porque las sales de ácidos orgánicos se seleccionan de entre cualquiera de la lista: sódica, cálcica, cúprica o potásica. Las proporciones en las que se encuentra la sal del ácido orgánico en el aditivo para alimentación animal descrito en la presente invención, suele variar entre un 30% y un 70% en peso húmedo del producto final, siendo más preferible una proporción del 60%.

En otra realización preferida, los aditivos de la invención, se caracterizan porque la sal preferida es la sal sódica y el ácido orgánico preferido es el ácido butírico, siendo por tanto, preferida en los aditivos de la invención, la sal sódica del ácido butírico.

En otra realización preferida, los aditivos de la invención, se caracterizan porque la sal del ácido orgánico se encuentra preferentemente a una concentración del 60% en peso húmedo del producto final.

En otra realización preferida, los aditivos de la invención, se caracterizan porque los principios activos de origen vegetal son preferentemente aceites esenciales y pueden seleccionarse de entre cualquiera de la lista: jengibre, piperina, orégano, timol, ajo, carvacrol, cinamaldehído y/o cualquiera de sus combinaciones, siendo preferentemente utilizada la combinación de aceite esencial de jengibre y piperina.

En otra realización preferida, los aditivos de la invención, se caracterizan porque los principios activos vegetales se encuentran preferentemente en una proporción de entre el 1% y el 20% del peso húmedo del producto final, siendo la proporción preferida de un 10% del peso húmedo del producto final.

En otra realización preferida, los aditivos de la invención, se caracterizan porque en la combinación de aceites esenciales de jengibre y piperina se utiliza preferentemente un 5% de aceite de jengibre y un 5% de aceite de piperina.

En otra realización preferida, los aditivos de la invención, se caracterizan porque el recubrimiento parcial de la combinación de las sales de ácidos orgánicos con los principios activos de origen vegetal, con aceites y/o grasas vegetales, es aproximadamente entre un 30-60% del peso húmedo del producto final, siendo más preferentemente un recubrimiento de un 30%.

En otra realización preferida, los aditivos de la invención, se caracterizan porque los aceites y/o grasas vegetales que recubren parcialmente la combinación de las sales de ácidos orgánicos con los principios activos de origen vegetal, se seleccionan entre: estearina de palma o jabón cálcico de ácidos grasos de aceite de palma (PFAD), siendo preferida la estearina de palma.

En otra realización preferida, los aditivos de la invención, se caracterizan porque la sal es preferentemente la sal sódica del ácido orgánico butírico, el principio activo de origen vegetal está formado preferentemente por la combinación de aceites esenciales, siendo éstos preferentemente el aceite esencial de jengibre y el de piperina y la cubierta de aceites y/o grasas vegetales está preferentemente formada por estearina de palma.

En otra realización preferida, los aditivos de la invención se caracterizan porque la concentración de butirato sódico es preferentemente de un 60%, la concentración de la

combinación de aceites esenciales de jengibre y piperina es preferentemente de un 10% y la cubierta de estearina de palma es preferentemente de un 30%.

En otra realización preferida, la combinación de aceites esenciales de jengibre y piperina está formada preferentemente por un 5% de aceite de jengibre y un 5% de aceite de piperina.

Otro de los objetos descritos en la presente invención se refiere al uso de los aditivos descritos anteriormente, para alimentación animal, como promotores del crecimiento de los animales, preferentemente de pollos, conejos y cerdos.

Otro de los objetos descritos en la presente invención se refiere al uso, en alimentación animal en animales de cría alimentados con los aditivos descritos previamente, como moduladores de la respuesta inmune. En una realización preferida, la modulación de la respuesta inmune comprende una variación de la expresión de alguno de los genes que codifican para alguna de las siguientes citocinas: aumentando la expresión de IL-1β, IL-2, CD3γδ y/o disminuyendo la expresión de TNFSF15.

Otro de los objetos descritos en la presente invención se refiere al uso, en alimentación animal, en animales de cría alimentados con los aditivos descritos previamente, como bactericidas, al inhibir el crecimiento tanto de bacterias Gram+, preferentemente bacterias del género Clostridium, más preferentemente *C. perfringens*, Gram–, preferentemente bacterias de la familia Enterobacteriaceae, más preferentemente de los géneros Salmonella, *Eschericia* y Campylobacter e incluso protozoos, como es el caso de los protozoos de la familia de Eimeria y Criptosporideos.

Los ejemplos que se describen a continuación tienen como objetivo ilustrar la presente invención, pero sin limitar el alcance de la misma.

Ejemplo 1. Examen patológico macroscópico e histopatológico en pollos de engorde a los que se les induce enteritis necrótica y tratados con diferentes aditivos alimenticios.

Se utilizaron pollos de engorde convencionales (híbridos Bábolna, Bábolna, Hungría) que tenían un día de edad cuando entraron a formar parte de los diferentes grupos de tratamiento descritos en la presente invención. Aunque los ejemplos son realizados en

pollos de engorde (ganadería avícola), los aditivos alimenticios potenciadores del crecimiento animal y con acción bactericida natural, descritos en la presente invención, pueden ser utilizados en cualquier otro tipo de ganadería, como por ejemplo: porcina, cunícola, ovina, bovina, etc.

Los pollos de engorde fueron alimentados con una dieta convencional libre de medicamentos y rica en proteínas (25% de harina de pescado). Dicho alimento no presentaba coccidiostáticos (agentes útiles en el tratamiento o prevención de la coccidiosis en hombres y/o animales). Los animales no tenían restricción de agua y fueron guardados en jaulas a una densidad de 30 animales/m^2. Los lechos, bebederos y comederos fueron esterilizados previamente en autoclave. La temperatura ambiente fue establecida en 32 ± 4°C, disminuyendo hasta 24 ± 4°C a medida que los animales crecían.

Para producirles la enteritis necrótica, dichos animales fueron inoculados con la cepa alfa toxigénica tipo A de *C. perfringens* (ATCC 13124). Dicha cepa fue crecida en medio de cultivo Reinforced Clostridial Medium (BD, MD, USA) a una temperatura de 37ºC durante 24 horas en anaerobiosis haciendo uso del sistema Anaerocult A (Merck, Darmstadt, Alemania). Posteriormente, dichos cultivos bacterianos fueron centrifugados (3000 g, 10 min., 5ºC, centrífuga Universal 320R, Hettich centrifugas) y el pellet obtenido resuspendido en una solución de suero fosfato salino (PBS) estéril. El título de *C. perfringens* fue de 3-4x10^8 unidades formadoras de colonias (CFU)/ml. La enteritis necrótica muestra signos clínicos sólo si están presentes factores de predisposición, por lo tanto dichos animales fueron infectados oralmente con coccidios mediante la vacunación con la vacuna viva atenuada Paracox 5® (Ceva-Phylaxia) y con *C. perfringens A*.

En la Tabla 1 se muestra el protocolo de infección y vacunación utilizado en la presente invención. Brevemente, los animales fueron vacunados frente a la enfermedad de Gumboro o enfermedad de bursitis infecciosa (IBD, en sus siglas en inglés). Es una enfermedad altamente contagiosa en pollos jóvenes causada por el virus de la enfermedad de bursitis infecciosa (IBDV) y que se caracteriza por la inmunosupresión y la mortalidad de los animales, generalmente a la edad de 3 a 6 semanas de vida. La vacuna frente a dicha enfermedad (CEVAC Gumbo L®, Ceva-Phylaxia) se les administró en el agua el día 16, para producir en los animales una moderada inmunosupresión y ser más propensos a padecer la enteritis necrótica. Posteriormente, se procedió la inoculación, por vía oral a través de sonda nasogástrica, de 2mL de una suspensión de *C. perfringens* (6.8x10^8 UFC)

durante tres veces al día (8.00 am, 12.00 am y 16.00 pm) en los días 18, 19, 20 y 21. El día 19, se les administró además, una dosis 10 veces mayor de la habitual, de la vacuna viva atenuada Paracox-5® (Ceva-Phylaxia), para inducirles la infección por coccidios y predisponer a los animales a la enfermedad clínica. La vacuna Paracox-5® es una vacuna viva atenuada que contiene ooquistes esporulados derivados de líneas precoces de coccidios que son patógenas para los pollos: *Eimeria acervulina, Eimeria brunetti, Eimeria maxima, Eimeria mitis, Eimeria necatrix, Eimeria praecox y Eimeria tenella*. Los animales control también fueron tratados con las vacunas frente a la enfermedad de Gumboro y con la vacuna de Paracox-5®.

Tabla 1. Protocolo de infección y vacunación

Edad de los pollos (días)	**1**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**	**21**
Vacunación frente a Gumboro		■					
Infección con clostridios				■	■	■	■
Vacunación con Paracox-5® (dosis 10 veces mayor que la habitual)					■		

Los pollos de engorde (n=24), incluidos en el presente ejemplo fueron divididos en tres grupos (12 animales/grupo, Tabla 2). Todas las aves fueron tratadas con las vacunas frente a la enfermedad de Gumboro y con la vacuna de Paracox-5® en los días indicados en la Tabla 1. Todos los animales de cada grupo fueron infectados oralmente con *C. perfringens A* ($6\text{-}8x10^8$ CFU). El grupo de animales control fue alimentado con la dieta base descrita, sin ningún aditivo. En cambio, al otro grupo de animales se le administró en la dieta una concentración de 1.5 g/Kg de pienso, del aditivo descrito en la presente invención: butirato sódico junto con jengibre y piperina, estando ambos principios recubiertos en un 30% en peso húmedo, con grasas vegetales, específicamente con estearina de palma. Se utilizó como butirato sódico, la composición de Norel, S.A. llamada BP-70 a la que se le añadieron como aceites esenciales el jengibre (CAS 84696-15-1) (5% en peso húmedo) obtenido de Ventós S.A. (Barcelona, España) y la piperina (5% en peso húmedo) obtenida de la empresa Sensient Fragances S.A. (Granada, España). El BP-70 está formado por un 70% en peso húmedo de butirato sódico y un 30% en peso húmedo de grasas vegetales. El 30% de la grasa vegetal protege aproximadamente el 43% del butirato sódico total, así por tanto, el producto BP-70 se puede decir que está formado por un 30% de butirato sódico protegido y por un 40% de butirato sódico sin proteger. Los aceites esenciales de jengibre y piperina, quedan recubiertos con los mismos porcentajes que el butirato sódico. Todos los

aditivos para piensos fueron suministrados por Norel, SA, España. El peso corporal de los animales se midió durante el experimento en los días 1, 4, 7, 10, 14, 18, 21. Todos los animales fueron sacrificados en el día 25.

Tabla 2: Diseño Experimental.

Grupo de animales	BP-70 + Jengibre + piperina (g/kg pienso)	Paracox-5®	Gumboro	*C. perfringens* A
A (n=12)	-	+	+	+
B (n=12)	1.5 g/kg	+	+	+

Grupo A=control, Grupo B= BP-70+Jengibre+piperina, Group C= aceites esenciales.

En la Figura 1 se muestra que ya en el día 17, justo el día anterior a la infección con *C. perfringens* A, el grupo de animales tratados con BP-70+Jengibre+piperina (Grupo B) presentaba un incremento de su masa corporal respecto al grupo control infectado pero no tratado con ningún aditivo alimenticio (Grupo A) (p=0.002). Posteriormente se realizó otro análisis de peso corporal de cada uno de los grupos de animales incluidos en el estudio en el día 24, un día antes del sacrificio de los mismos. Como se observa en la Figura 2 y al igual que sucedió con el análisis de peso realizado en día 17 (Figura 1), dicho análisis puso de manifiesto que el tratamiento con BP-70+Jengibre+piperina, mostró una tasa de crecimiento corporal significativamente mayor que el grupo de animales control infectados pero no tratados con ningún aditivo alimenticio (p=0.001).

A continuación se procedió a la realización de un análisis histopatológico de las muestras recogidas de distintos órganos de cada grupo de animales: hígado, bazo y la sección distal del yeyuno. Las muestras frescas fueron sumergidas inmediatamente en formol al 10% para su conservación hasta que fuesen utilizadas en los análisis posteriores. Las lesiones microscópicas se clasificaron de acuerdo con el método de Gholamiandehkordi et al. (2007), con pequeñas desviaciones: 0=negativo; 1=inflamación del intestino; 2=necrosis focal (1.2 cm) o cambios degenerativos en la mucosa (la apariencia grasosa); 3=necrosis irregular (3-4 cm) y 4=necrosis difusa. La presencia de enteritis (por lo general linfo-histiocítica) también se indicó.

En la Figura 3 se muestra una comparación de la gravedad de las lesiones macroscópicas que presentaba el grupo de animales tratados con BP-70+Jengibre+piperina (Grupo B)

respecto al grupo de animales control infectados pero no tratados con ningún aditivo. Como se puede observar en dicha Figura 3, el Grupo B (BP-70+Jengibre+piperina) mostró puntuaciones significativamente más bajas que el grupo control (p=0.001). Por tanto, dichos resultados ponen de manifiesto que el tratamiento con BP-70+Jengibre+piperina (Grupo B) disminuye significativamente las lesiones macroscópicas que presentaban los pollos de engorde infectados con *C. perfringes A* respecto al grupo de animales control que presentaban infección pero a los que no se les administró ningún tipo de aditivo (Grupo A).

Así, mediante el presente ejemplo se pone de manifiesto que el tratamiento el aditivo alimenticio descrito en la presente invención, butirato sódico junto con aceites esenciales vegetales, jengibre y piperina, y todo ello parcialmente recubierto con grasas vegetales, produce un incremento significativo en el peso de los animales a los que se les indujo necrosis entérica artificial mediante la inoculación de *C. perfringens A* y que han sido tratados con dicho aditivo (Grupo B) respecto al grupo de animales control, que también presentaban la infección pero que no han sido tratados con dicho aditivo (Grupo A). También, el presente ejemplo pone de manifiesto la mejora de las lesiones, principalmente intestinales (producidas por la infección con *C. perfringens A*), que presentan las muestras extraídas del grupo de animales tratado con el aditivo de la invención (Grupo B) respecto al grupo de animales control no tratados con ningún aditivo (Grupo A).

Ejemplo 2. Determinación de la respuesta inmune del tejido linfoide asociado al intestino (GALT) en pollos de engorde que padecen enteritis necrótica y que son tratados con diferentes aditivos alimenticios.

Para determinar la respuesta inmune del GALT, se realizó otro ensayo experimental también con pollos de engorde (n=48) que fueron divididos en seis grupos (6 animales/grupo, Tabla 3). Todas las aves, al igual que en el Ejemplo 1, también fueron tratados con vacunas de Gumboro y Paracox-5® en los días indicados en la Tabla 1. Los grupos A, C y D están formados por los pollos de engorde no infectados con *C. perfringes A*, mientras que los grupos B, E y F están formados por los pollos de engorde infectados por vía oral, con *C. perfringens A* (6-8x10^8 CFU). La dieta básica de los animales es la misma que la descrita en el Ejemplo 1, pero complementada con diferentes aditivos para piensos: (i) 1,5 g de BP-70/Kg. de alimento (grupos C y E), (ii) 1,5 g de BP-70+Jengibre+piperina/kg de alimento (Grupos D y F). Todos los aditivos para piensos fueron suministrados por Norel, SA, (Madrid, España).

Tabla 3. Diseño Experimental

Grupo	BP-70 (g/kg pienso)	BP-70+Jengibre + piperina (g/kg pienso)	Vacuna Paracox-5®	Vacuna Gumboro	*Clostridium. perfringens* A
A	-	-	+	+	-
B	-	-	+	+	+
C	1.5 g/kg	-	+	+	-
D	-	1.5 g/kg	+	+	-
E	1.5 g/kg	-	+	+	+
F	-	1.5 g/kg	+	+	+

Los pollos fueron sacrificados en el día 22 y se tomaron muestras intestinales de aproximadamente 5 cm de largo del yeyuno entre el divertículo de Meckel y la región ilíaca. Las secciones intestinales fueron cortadas longitudinalmente, y se lavaron tres veces con PBS helado que contenía 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (Fischer científico). La capa de la mucosa se raspó con un portaobjetos de vidrio estéril y el tejido intestinal fue sumergió inmediatamente en 1 ml de Trizol helado (Invitrogen), para posteriormente extraer el ARN según se indica en las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron homogeneizadas y se mantenidas a -80ºC hasta ser procesadas.

Para evaluar la respuesta inflamatoria e inmune después de inducir en los animales la infección con la enteritis necrótica y comparar el efecto de cada uno de los tratamientos con los diferentes aditivos descritos en la Tabla 3, se evaluaron los cambios en los niveles de expresión de diferentes citocinas mediante la técnica de PCR cuantitativa (qRT-PCR). Las citocinas analizadas fueron: interleucina-1 beta (IL-1β), interleucina-2 (IL-2), interleucina-8 (IL-8), interleucina-10 (IL-10), receptor CD3γδ, lipopolisacárido de necrosis tumoral inducida por el factor alfa (LITAF) y factor 15 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNFSF15). Los genes control usados de referencia fueron: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y β-actina. Los cebadores utilizados para cada uno de los genes mencionados se muestran en la Tabla 4. Las interleucinas-1, 2, 8 y 10 son miembros de la familia de las interleucina, indispensables en la respuesta inmune celular y humoral. El receptor CD3 (Cluster de Diferenciación 3) es un receptor de destino se encuentra en todas las células-T, el LITAF es una citocina de la familia del TNF que se libera después de la inducción LPS y el TNFSF15 está presente en las células endoteliales y también participa en la proliferación, diferenciación y apoptosis de las células del sistema inmune.

Para analizar las diferencias significativas que presentaron cada uno de los grupos de tratamiento descritos previamente en el nivel de expresión de los genes analizados se utilizó el test de ANOVA.

Tabla 4. Cebadores utilizados en la técnica qRT-PCR

ARN	Cebadores		Tamaño producto	Nº Acceso al GenBank
Gen	Directo	Inverso	(bp)	
GAPDH	SEQ ID NO. 1	SEQ ID NO. 2	264	NM_204305
β-actina	SEQ ID NO. 3	SEQ ID NO. 4	169	NM_205518
IL-1β	SEQ ID NO. 5	SEQ ID NO. 6	80	NM_204524
IL-2	SEQ ID NO. 7	SEQ ID NO. 8	148	NM_204153
IL-8	SEQ ID NO. 9	SEQ ID NO. 10	200	NM_205498
IL-10	SEQ ID NO. 11	SEQ ID NO. 12	94	NM_001004414
CD3γδ	SEQ ID NO. 13	SEQ ID NO. 14	166	NM_205512.1
LITAF	SEQ ID NO. 15	SEQ ID NO. 16	229	NM_204267
TNFSF15	SEQ ID NO. 17	SEQ ID NO. 18	292	NM_001024578

Para poner de manifiesto los efectos inmunomoduladores que proporcionan los aditivos alimenticios administrados a los diferentes grupos de animales descritos en el presente ejemplo infectados o no con *C. perfringens*, se compararon los grupos de animales C y D tratados con alguno de los aditivos mencionados y que no presentaban infección respecto al grupo de animales control no tratado y no infectado (Grupo A). Y por otro lado, se compararon los grupos de animales E y F tratados con los aditivos BP-70 o BP-70+jengibre+piperina, respectivamente y que presentaban enteritis necrótica, respecto al grupo de animales infectado con *C. perfringens* pero no tratado con ningún aditivo de los descritos en la presente invención (Grupo B).

En primer lugar se comparó el nivel de expresión de las citocinas analizadas en el grupo de animales control no tratados y que no han sido infectados con *C. perfringens A* (Grupo A) respecto a los grupos de animales no infectados con *C. perfringens A* pero tratados con los aditivos alimentarios BP-70 (Grupo C) y BP-70+Jengibre+piperina (Grupo D), para analizar los efectos inmunomoduladores naturales de dichos aditivos.

La Figura 4 A, B y C muestra el efecto inmunomodulador de los aditivos: BP-70 y BP-70+Jengibre+piperina, sobre el nivel de expresión de los genes IL-1β, IL-2, IL-8, IL-10, CD3γδ, LITAF y TNFSF15. Los ratios relativos de expresión de dichos genes en los grupos tratados C y E, se compararon con los animales no tratados (Grupo A). Ninguno de los grupos estaba infectado con *C. perfringens A*. La Figura 4 A muestra que el tratamiento con BP-70 (Grupo C) no produjo ningún cambio en los niveles de expresión de los genes analizados. Los mayores cambios en el perfil de expresión de las genes analizados se produjeron debido al tratamiento con el aditivo BP-70+Jengibre+piperina (Grupo D) (Figura 4B). Tres de los genes investigados estaban sobreexpresados en el grupo de animales que tomaban BP-70+Jengibre+piperina (Grupo D), respecto al grupo de animales control que no lo tomaban (Grupo A). Dichos genes fueron: IL-1β (p=0.028), IL-2 (p=0,026) y CD3γδ (p=0.011). Por otro lado, uno de los genes analizados, TNFSF15, mostró una infraexpresión (p=0.004). Esta infraexpresión se reprodujo también (Figura 4C) cuando se comparó el grupo de animales control no infectados y sin tratamiento (Grupo A) con el grupo de animales infectados y tratados con el aditivo descrito en la presente invención BP+70+Jengibre+piperina (grupo F). La sobreexpresión de los genes IL-1β e IL-2 indica la activación de la cascada de la respuesta inmune, dando lugar a la estimulación de la proliferación y maduración de los linfocitos. Estas observaciones se ven confirmadas por el aumento de la expresión génica de CD3γδ que representa un recuento total elevado de células T.

Por otro lado, en la Figura 5 se muestra el nivel de expresión de cada una de las citocinas analizadas: IL-1β, IL-2, IL-8, IL-10, CD3γδ, LITAF y TNFSF15, en cada uno de los grupos de animales tratados con cada uno de los aditivos descritos en el presente ejemplo y que estaban o no infectados con *C. perfringes A* (Grupos C a F), así como en el grupo de animales control infectado con *C. perfringes A*, pero no tratado con ninguno de dichos aditivos (Grupo B). La Fig. 5 pone de manifiesto que el tratamiento con BP-70+Jengibre+piperina (Grupo E), produjo una infraexpresión del gen TNFSF15 tanto en el grupo de animales control sin infectar y sin tomar ningún aditivo en su dieta (Grupo A), como en el grupo de animales infectados pero que tampoco tomaban ningún aditivo en su dieta (Grupo B).

En segundo lugar se analizaron los efectos inmunomoduladores que proporcionan los aditivos alimenticios administrados a los animales de los grupos E (BP-70) y F (BP-70+Jengibre+piperina), tratados con los aditivos mencionados y que presentaban enteritis

necrótica, respecto al grupo de animales infectado con *C. perfringens* pero no tratado con ningún aditivo de los descritos en la presente invención (Grupo B).

En la Figura 6 se muestra el nivel de expresión de los genes IL-1β, IL-2, IL-8, IL-10, CD3γδ, LITAF y TNFSF15 en el grupo de animales infectados con *C. perfringes A* y que están tratados con el aditivo alimenticio descrito en la presente invención, BP-70+Jengibre+piperina (Grupo F), respecto al nivel de expresión de dichos genes que presentaba el grupo de animales control infectado con *C. perfringes A* pero que no ha sido alimentado con los aditivos utilizados en el presente ejemplo (Grupo B). Dicho análisis se realiza con el fin de analizar los efectos de dichos aditivos en la evolución de la infección. Como se puede observar en dicha Figura 6, se produjo un incremento significativo en los niveles de expresión de la citocina IL-2 respecto al grupo control no tratado (Grupo B). Además, dicho grupo de animales tratado con BP-70+Jengibre+piperina presentó un descenso en los niveles de expresión de TNFSF15 respecto al grupo de animales control no tratados (Grupo B).

De la misma manera, en la Figura 7, se muestra el nivel de expresión de las citocina TNFSF15 en el grupo de animales infectados y tratados con BP-70+Jengibre+piperina (Grupo F) respecto al grupo de animales control infectados pero no tratados (Grupo B). El tratamiento con BP-70+Jengibre+piperina (Grupo F) produjo una infraexpresión de TNFSF15, respecto al grupo control (Grupo B).

De acuerdo con los resultados mostrados en el presente ejemplo, el tratamiento con butirato sódico + aceites esenciales, ejemplificado en la presente invención mediante el tratamiento con BP-70+Jengibre+piperina, fue capaz de mostrar una acción moduladora significativa en la respuesta inmune produciendo un incremento en la expresión de los genes que codifican para las citocinas IL-1β, IL-2 y CD3γδ y un descenso en la expresión del gen que codifica para la citocina TNFSF15, dando lugar a un efecto protector frente a la infección artificial producida por *C. perfringens A.* Además, como se ha puesto de manifiesto en los resultados mostrados en el Ejemplo 1, el tratamiento con el aditivo descrito en la presente invención, también es capaz de inducir un incremento en la ganancia de peso de los animales sometidos a dicho tratamiento y disminuir la gravedad de las lesiones histológicas que presentan dichos animales como consecuencia de la infección con *C. perfringens A.*

BIBLIOGRAFIA

1. Dipeolu et al., Biocatalytic amide reduction using Clostridium sporogenes. Biotechnol Lett. 2005 Nov;27(22):1803-7.
2. Fernández-Rubio C, Ordóñez C, Abad-González J, Garcia-Gallego A, Honrubia MP, Mallo JJ, Balaña-Fouce R. Butyric acid-based feed additives help protect broiler chickens from Salmonella Enteritidis infection. Poult Sci. 2009 May;88(5):943-8.
3. Gálfi P, Bokori J. Feeding trial in pigs with a diet containing sodium n-butyrate. Acta Vet Hung. 1990;38(1-2):3-17.
4. Gholamiandehkordi AR, Timbermont L, Lanckriet A, Van Den Broeck W, Pedersen K, Dewulf J, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R, Van Immerseel F. Quantification of gut lesions in a subclinical necrotic enteritis model. Avian Pathol. 2007 Oct;36(5):375-82.
5. Katoh K y Tsuda T, Effects of acetylcholine and short-chain fatty acids on acinar cells of the exocrine pancreas in sheep. J Physiol. 1984 Nov;356:479-89.
6. Leeson S, Namkung H, Antongiovanni M, Lee EH. Effect of butyric acid on the performance and carcass yield of broiler chickens.Poult Sci. 2005 Sep;84(9):1418-22.
7. Sano H, Nakamura E, Takahashi H, Terashima Y. Plasma insulin and glucagon responses to acute challenges of acetate, propionate, n-butyrate and glucose in growing gilts (Sus scrofa). Comp Biochem Physiol A Physiol. 1995 Apr;110(4):375-8.
8. Van Immerseel, F., V. Fievez, J. De Buck, F. Pasmans, A. Martel, F. Haesebrouck, and R. Ducatelle. 2004. Microencapsulated short-chain fatty acids in feed modify colonization and invasion early after infection with Salmonella Enteritidis in young chickens. Poult. Sci. 83:69–74.

REIVINDICACIONES

1.- Aditivo para alimentación animal que comprende la combinación de sales de ácidos orgánicos con al menos un principio activo de origen vegetal, parcialmente recubierta dicha combinación con aceites y/o grasas vegetales.

2.- Aditivo para alimentación animal según la reivindicación 1 donde los ácidos orgánicos se seleccionan de entre cualquiera de la lista: butírico, propiónico, fórmico, láctico, cítrico, láurico, cúprico, caprílico, caproico o acético.

3.- Aditivo para alimentación animal según la reivindicación 1 donde las sales de ácidos orgánicos se seleccionan de entre cualquiera de la lista: sódica, cálcica, cúprica o potásica.

4.- Aditivo para alimentación animal según las reivindicaciones 1 a 3 caracterizado porque la sal del ácido orgánico es preferentemente la sal sódica del ácido butírico.

5.- Aditivo para alimentación animal según las reivindicaciones 1 a 4 caracterizado porque la sal del ácido orgánico se encuentra preferentemente en una proporción de entre un 30-70% en peso húmedo, siendo más preferible una proporción del 60%.

6.- Aditivo para alimentación animal según la reivindicación 1 donde los principios activos de origen vegetal son preferentemente aceites esenciales y pueden seleccionarse de entre cualquiera de la lista: jengibre, piperina, orégano, timol, carvacrol, cinamaldehído, ajo y/o cualquiera de sus combinaciones.

7.- Aditivo para alimentación animal según la reivindicación 6 donde el principio activo de origen vegetal es preferentemente una combinación de aceites esenciales de jengibre y de piperina.

8.- Aditivo para alimentación animal según cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque los principios activos vegetales se encuentran preferentemente a una concentración de entre un 1-20% en peso húmedo, preferentemente a una concentración del 10%.

9.- Aditivo para alimentación animal según las reivindicaciones 7 y 8 caracterizado porque la concentración preferida de jengibre y piperina es del 5% en peso húmedo de jengibre y 5% en peso húmedo de piperina.

10.- Aditivo para alimentación animal según la reivindicación 1 caracterizado porque el recubrimiento parcial de la combinación de las sales de ácidos orgánicos con los principios activos de origen vegetal, con aceites y/o grasas vegetales, es aproximadamente entre un 30-60% en peso húmedo, siendo más preferentemente un recubrimiento de un 30%.

11.- Aditivo para alimentación animal según la reivindicación 10 donde los aceites y/o grasas vegetales que recubren parcialmente la combinación de las sales de ácidos orgánicos con los principios activos de origen vegetal, se seleccionan entre: estearina de palma o jabón cálcico de ácidos grasos de aceite de palma (PFAD).

12.- Aditivo para alimentación animal según las reivindicaciones 1 a 11 caracterizado porque la sal es preferentemente la sal sódica del ácido orgánico butírico, el principio activo de origen vegetal es preferentemente una combinación de aceite esencial de jengibre y piperina y la cubierta de aceites y/o grasas vegetales está preferentemente formada por estearina de palma.

13.- Aditivo para alimentación animal según la reivindicación 12 caracterizado porque la concentración de butirato sódico es preferentemente un 60% peso húmedo, la concentración de la combinación de aceites esenciales de jengibre y piperina es preferentemente un 10% peso húmedo y la cubierta de estearina de palma es preferentemente de un 30% peso húmedo.

14.- Aditivo para alimentación animal según la reivindicación 13 caracterizado porque la concentración de jengibre es del 5% en peso húmedo y la concentración de piperina es del 5% en peso húmedo.

15.- Uso de los aditivos para alimentación animal de las reivindicaciones 1 a 14 como promotores del crecimiento de los animales.

16.- Uso según la reivindicación 15 donde los animales son preferentemente pollos, conejos y cerdos.

17.- Uso de los aditivos para alimentación animal de las reivindicaciones 1 a 14 como moduladores de la respuesta inmune, en animales de cría alimentados con los mismos.

18.- Uso según la reivindicación 17 caracterizado porque la modulación de la respuesta inmune comprende una variación de la expresión de alguno de los genes que codifican para alguna de las siguientes citocinas: aumentando la expresión de IL-1β, IL-2 y CD3γδ y/o disminuyendo la expresión de TNFSF15.

19.- Uso de los aditivos para alimentación animal de las reivindicaciones 1 a 14 como bactericidas en animales de cría alimentados con los mismos.

20.- Uso según la reivindicación 19 caracterizado porque la acción bactericida es ejercida sobre bacterias Gram+, Gram –, y protozoos.

Figura 1

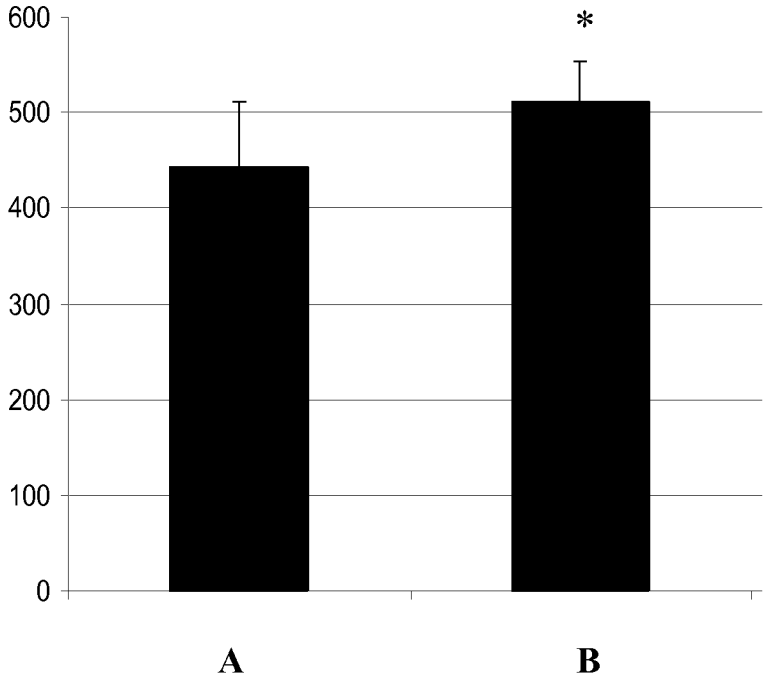


Figura 2

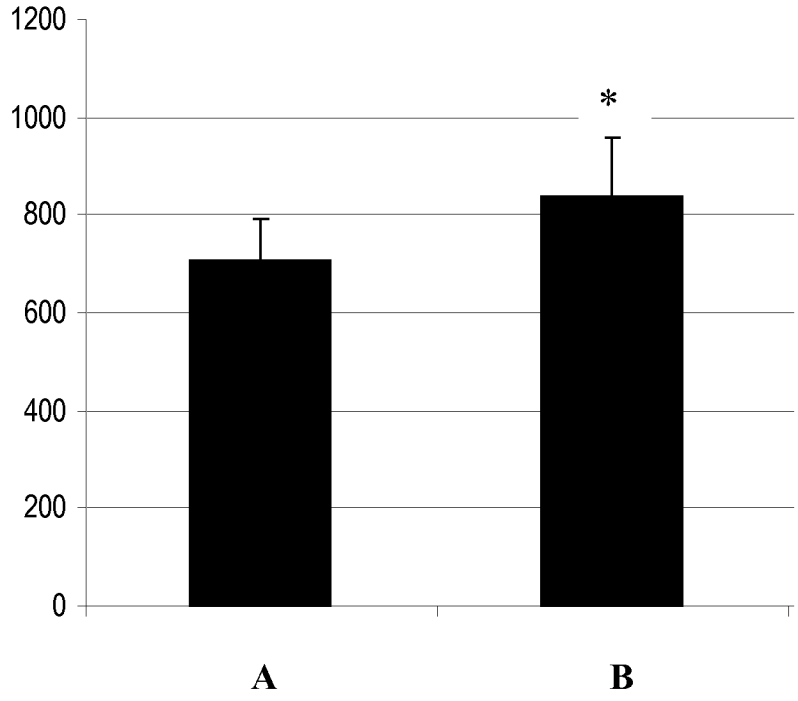


Figura 3

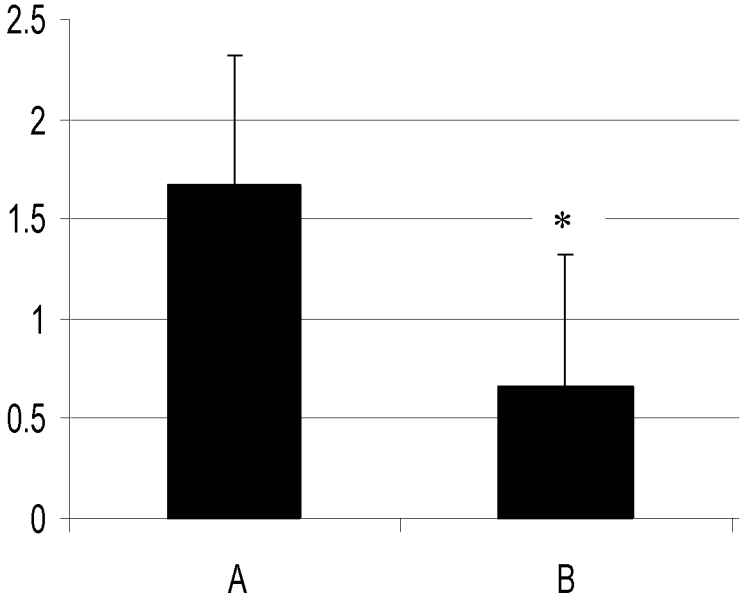
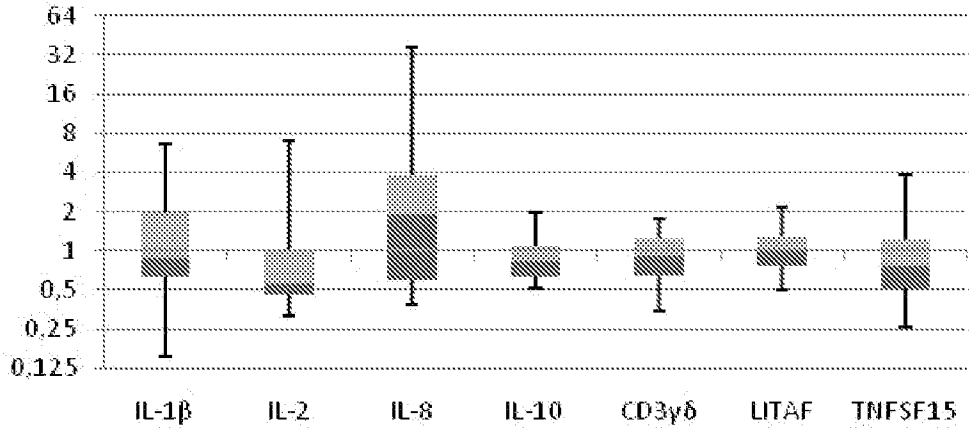
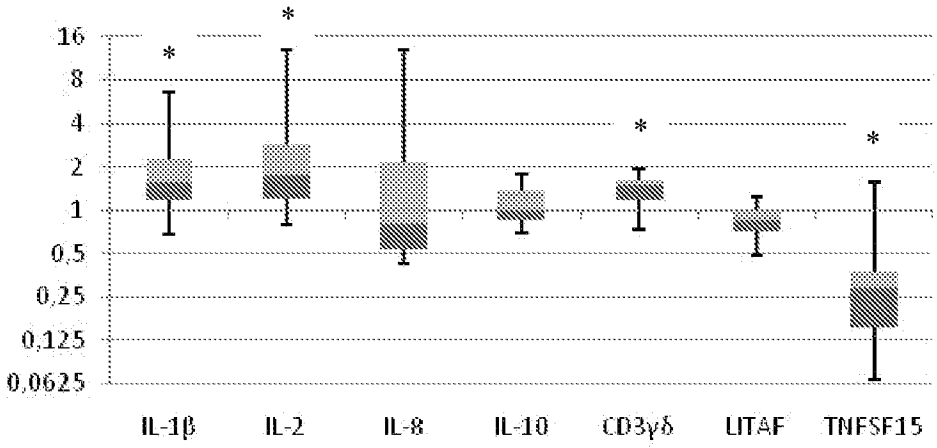


Figura 4

A


64
32
16
8
4
2
1
0,5
0,25
0,125
IL-1β
IL-2
IL-8
IL-10
CD3γδ
LITAF
TNFSF15

B


16
8
4
2
1
0,5
0,25
0,125
0,0625
*
*
*
*
IL-1β
IL-2
IL-8
IL-10
CD3γδ
LITAF
TNFSF15

C

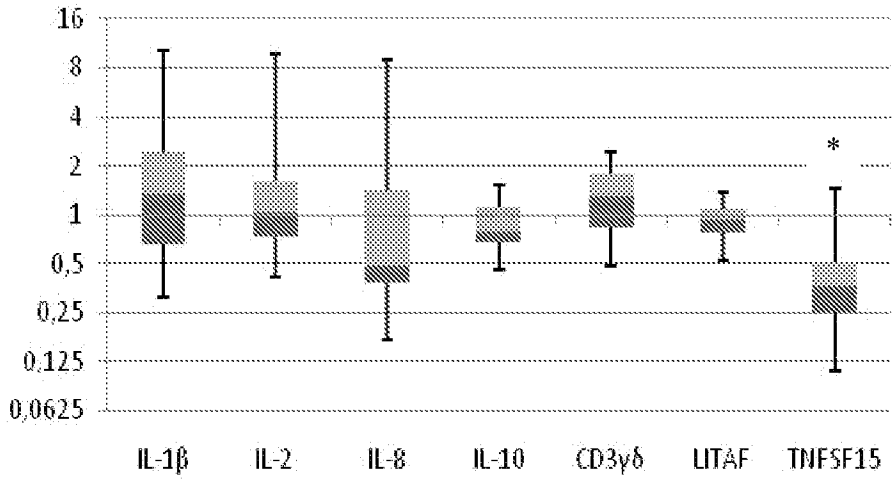

16
8
4
2
1
0,5
0,25
0,125
0,0625
*
IL-1β
IL-2
IL-8
IL-10
CD3γδ
LITAF
TNFSF15

Figura 5

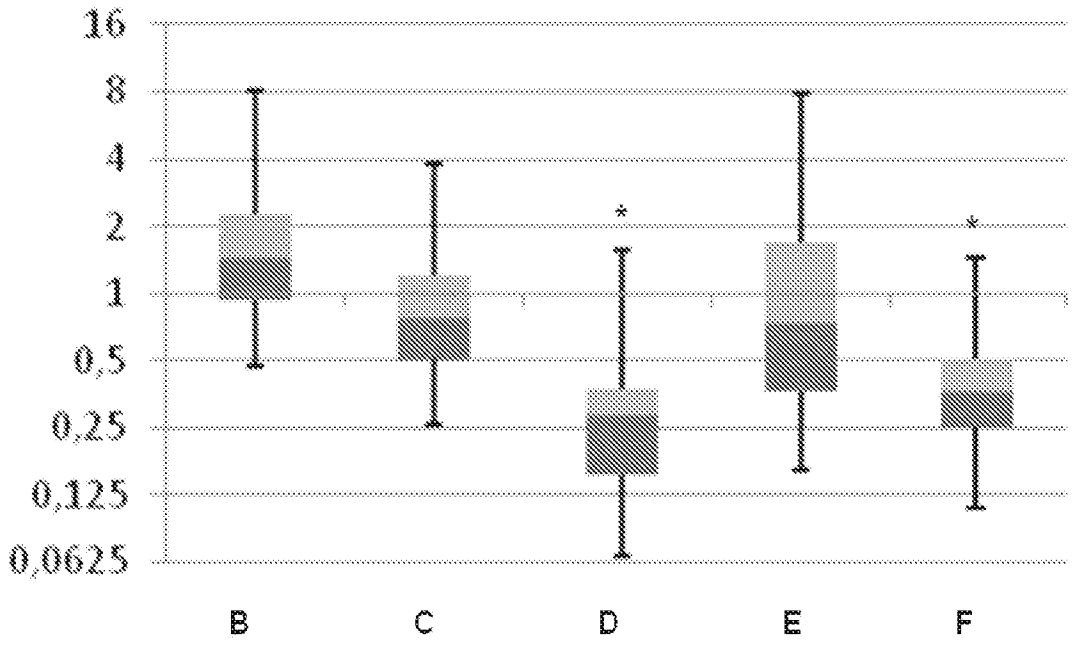


Figura 6

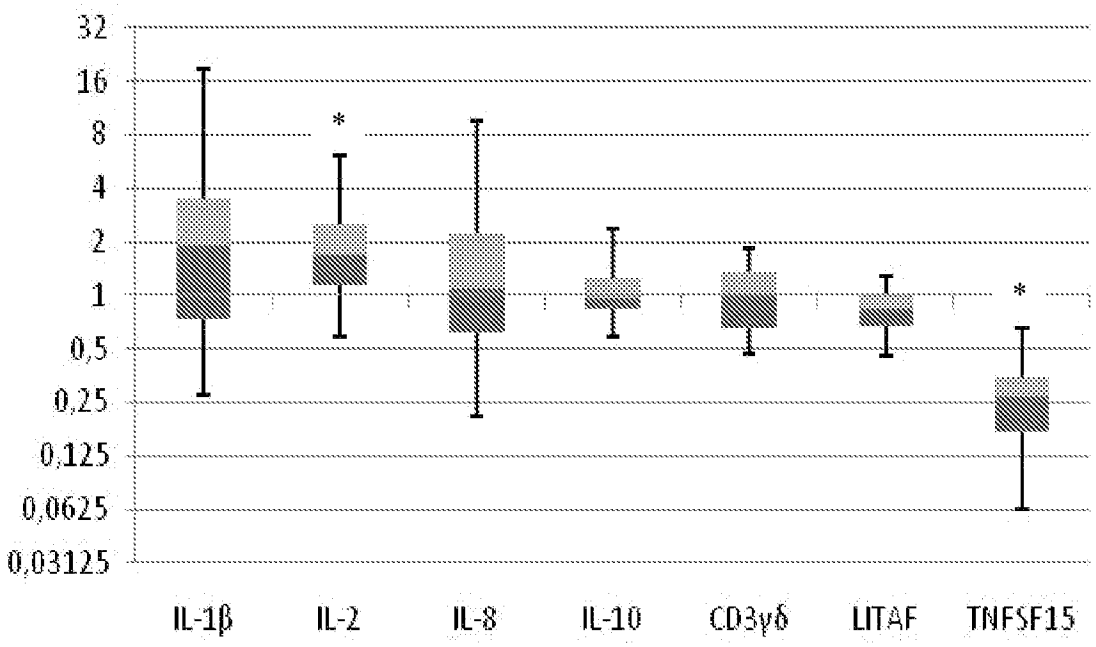
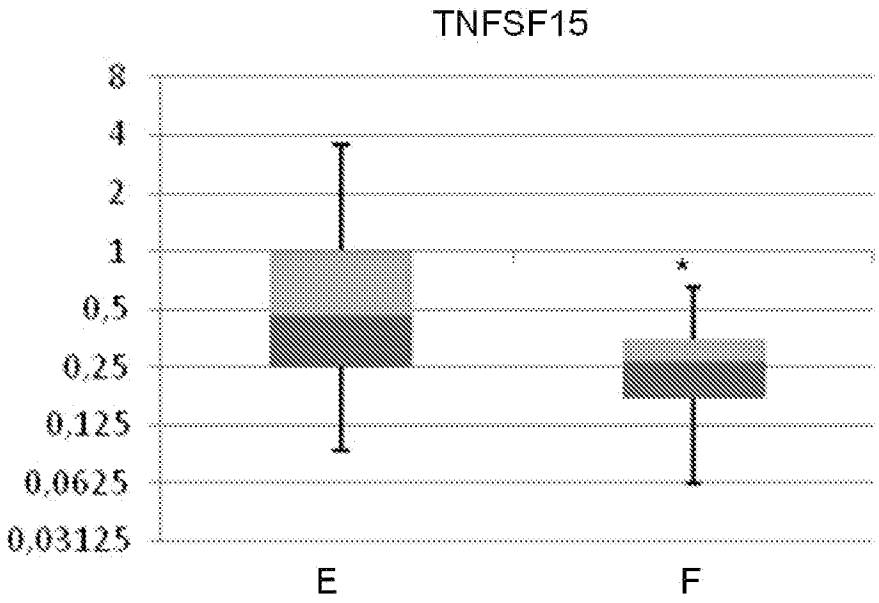

32
16
8
4
2
1
0,5
0,25
0,125
0,0625
0,03125
*
*
IL-1β
IL-2
IL-8
IL-10
CD3γδ
LITAF
TNFSF15

Figura 7



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Norel S.A.

<120> ADITIVOS PARA ALIMENTACIÓN ANIMAL

<130> P-04120

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador directo del gen GAPDH

<400> 1
ggtggtgcta agcgtgttat 20

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador inverso del gen GAPDH

<400> 2
acctctgtca tctctccaca 20

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador directo del gen beta-actina

<400> 3
gtccaccttc cagcagatgt 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador inverso del gen beta-actina

<400> 4
ataaagccat gccaatctcg 20

<210> 5
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador directo del gen IL-1 beta

<400> 5
gctctacatg tcgtgtgtga tgag 24

<210> 6
<211> 18
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador inverso del gen IL-1 beta

<400> 6
tgtcgatgtc ccgcatga 18

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador directo del gen IL-2

<400> 7
cccagcaaac tctgcagtgt t 21

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador inverso del gen IL-2

<400> 8
ccggtgtgat ttagacccgt a 21

<210> 9
<211> 19
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador directo del gen IL-8

<400> 9

ggcttgctag gggaaatga 19

<210> 10
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador inverso del gen IL-8

<400> 10
agctgactct gactaggaaa ctgt 24

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador directo del gen IL-10

<400> 11
ctttggctgc cagtctgtgt c 21

<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador inverso del gen IL-10

<400> 12
gctctgctga tgactggtgc t 21

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador directo del gen CD3

<400> 13
cagggattgt ggtcgcagat 20

<210> 14
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador inverso del gen CD3

<400> 14
tactgtccat cattccgctc ac 22

<210> 15
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador directo del gen LITAF

<400> 15
tgtgtatgtg cagcaacccg tagt 24

<210> 16
<211> 23
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador inverso del gen LITAF

<400> 16
ggcattgcaa tttggacaga agt 23

<210> 17
<211> 22
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador directo del gen TNFSF15

<400> 17
cctgagttat tccagcaacg ca 22

<210> 18
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador inverso del gen TNFSF15

<400> 18
atccaccagc ttgatgtcac taac 24

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201130070

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 21.01.2011

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) **Documentos citados**	**Reivindicaciones afectadas**
A	US 20090004308 A1 (FREHNER M. et al.) 01.01.2009, todo el documento.	1-21
A	WO 2008155536 A1 (DANISCO A/S) 24.12.2008, todo el documento.	1-21
A	WO 2004091307 A2 (ADVANCED BIONUTRITON CORPORATION) 28.10.2004, todo el documento.	1-21

Categoría de los documentos citados
X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	**Examinador**	**Página**
13.04.2012	M. A. García Coca	1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A23K1/00 (2006.01)
A61K31/19 (2006.01)
A61K31/232 (2006.01)
A61K36/67 (2006.01)
A61K36/9068 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A23K, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, XPESP/ELSEVIER, XPESP2, XPJPEG, XPMISC, XPOAC, XPTK, BIOSIS, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 13.04.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-21	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	1-21	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 20090004308 A1 (FREHNER M. et al.)	01.01.2009
D02	WO 2008155536 A1 (DANISCO A/S)	24.12.2008
D03	WO 2004091307 A2 (ADVANCED BIONUTRITON CORPORATION)	28.10.2004

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-20, es un aditivo para alimentación animal que comprende la combinación de sales de ácidos orgánicos (sal sódica de ácido butírico o butirato sódico) con al menos un principio activo de origen vegetal (jengibre y piperina), parcialmente recubierta dicha combinación con aceites y/o grasas vegetales (estearina de palma) (reiv. 1-14). Es también objeto de la invención el uso de dicho aditivo como promotor del crecimiento de animales (reiv. 15 y 16), como modulador de la respuesta inmune (reiv. 17 y 18) y como bactericida frente a bacterias patógenas presentes en dichos animales (reiv. 19 y 20).

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986) y Actividad Inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).

El documento D01 divulga una composición para alimentación animal (en concreto para aves de corral, cerdos y ganado). Dicha composición comprende un ácido orgánico o sus derivados (ácido benzoico) y una combinación de al menos 2 principios activos seleccionados entre piperina, timol y eugenol. En esta composición, los principios activos están adsorbidos sobre un silicato, y todo ello se encuentra mezclado con aceites vegetales y con el ácido orgánico (ver párrafos [0051] y [0057]). En este documento también se divulga su uso como modulador de la flora intestinal del animal y como agente antimicrobiano (bactericida y bacteriostático, entre otros) (ver párrafos [0021], [0022] y [0026]).

El documento D02 divulga un aditivo para la alimentación animal que presenta afectos antibióticos, para la inhibición del crecimiento o para reducir la población de bacterias patógenas en el animal, para acelerar el crecimiento del animal, para mejorar su sistema inmune y para mejorar la integridad de las células epiteliales del animal. La composición divulgada está formada por mezclas de aceites esenciales, entre los que se encuentran el timol y el cinamaldehído.

El documento D03 divulga aditivos para alimentación animal compuestos por 2 composiciones. Cada una de dichas composiciones está formada por al menos un compuesto no-volátil (entre los que se encuentran el timol, carvacrol, aceites esenciales de jengibre, y los ácidos acético, fórmico, y láctico) y al menos un compuesto volátil (entre los que se encuentran aceites y/o extractos de canela, de ajo y de pimienta). Estas composiciones presentan actividad antimicrobiana, antiséptica, anti-inflamatoria, y estimulación o inhibición enzimática, entre otras.

En el documento D01 se divulgan distintos componentes presentes en el aditivo objeto de la invención, sin embargo, en el aditivo descrito en el documento D01 dichos componentes se encuentran mezclados, mientras que en el aditivo de la invención, las sales de ácidos orgánicos, junto con el principio activo de origen vegetal se encuentran parcialmente cubiertos por los aceites y/o grasas vegetales. Esta disposición de los compuestos en el producto final conlleva un efecto técnico descrito en la memoria, como es la protección de los principios activos frente a la digestión estomacal y permitiendo que sean activos a lo largo de todo el tracto gastrointestinal de los animales (ver página 3 línea 33- página 4 línea 10).

En consecuencia, a la vista de los documentos del estado de la técnica, ninguno de los documentos citados (D01-D03), tomados solos o en combinación, revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-20, aunque en dichos documentos se divulguen aditivos para alimentación animal que contienen algunos componentes del aditivo objeto de la invención. Además, en los documentos citados no hay sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida por las reivindicaciones 1-20. Por lo tanto, el objeto de invención según se recoge en las reivindicaciones 1-20, cumple con el requisito de novedad en el sentido del artículo 6.1 LP 11/1986, e implica actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 LP 11/1986.