

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 835 381**

51 Int. Cl.:

A23K 20/10 (2006.01)
A61K 36/48 (2006.01)
A61K 36/42 (2006.01)
A23K 10/30 (2006.01)
A23K 20/163 (2006.01)
A23K 50/75 (2006.01)
A61P 33/00 (2006.01)
A61K 36/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.03.2019** **E 19161666 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2020** **EP 3539549**

54 Título: **Aditivo alimentario a base de saponinas para el tratamiento de la coccidiosis**

30 Prioridad:

12.03.2018 FR 1852100

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.06.2021

73 Titular/es:

NOR-FEED (100.0%)
3 rue Amedeo Avogadro
49070 Beaucouzé, FR

72 Inventor/es:

CHICOTEAU, PIERRE;
BERNABIA, AMINE;
WILTZ, MARIA y
PREVERAUD, DAMIEN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 835 381 T3

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

DESCRIPCIÓN

Aditivo alimentario a base de saponinas para el tratamiento de la coccidiosis

- 5 La invención se refiere a un aditivo alimentario destinado a un animal, en particular a aves de corral. También se refiere al uso de este aditivo alimentario para la prevención o el tratamiento de la coccidiosis en un animal, en particular en un ave de corral.

- 10 La coccidiosis es una patología parasitaria que puede afectar a varias especies animales como las aves de corral (por ejemplo pollos, gallinas, pavos, patos, pintadas, gansos), los rumiantes (por ejemplo bovinos, ovinos, caprinos), los cerdos y los conejos.

- 15 Los parásitos responsables de esta patología son los coccidios que son protozoos del género *Eimeria*. Existen numerosas especies más o menos patógenas. Las especies más patógenas presentes en el pollo son *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* y *Eimeria tenella*.

El ciclo de desarrollo del parásito se divide en varias fases, que tienen lugar en parte en el medio exterior, pero también en el intestino de los animales infestados, provocando así lesiones en diferentes lugares del tracto digestivo.

- 20 En el pollo:

- *Eimeria acervulina* va a provocar lesiones a nivel del duodeno (parte superior del intestino delgado);
- *Eimeria maxima* provocará la presencia de lesiones a nivel del yeyuno e íleon, y finalmente
- *Eimeria tenella* inducirá la presencia de lesiones en los ciegos.

- 25 La infestación se traduce entonces por una disminución en el consumo de agua y alimentos, una pérdida de peso, pero también por la presencia de diarreas. Las aves de corral están visiblemente enfermas. Las infestaciones más graves pueden dar lugar a la muerte del animal.

- 30 Existen numerosos coccidiostáticos que se han propuesto a fin de tratar la coccidiosis.

En primer lugar, los antibióticos permiten combatir esta patología. En efecto, existe una diversidad que permite combatir la coccidiosis, preparada por ejemplo a partir de *Streptomyces* como se describe en la solicitud de patente FR 2 356 667 A1 o también a base de éter de ácido policíclico obtenido por fermentación del microorganismo

- 35 Actinomadura como se divulga en la solicitud internacional WO93/12800 A1.

Por otro lado, las moléculas sintéticas también permiten tratar la coccidiosis. Puede tratarse de:

- 40
- pirroles como se describe en la solicitud internacional WO01/34 632 A2,
 - purinas como se describe en la solicitud EP 76 127 A2, o incluso
 - derivados de la riboflavina como se divulga en la solicitud de patente FR 2 368 956 A1.

También, existen vacunas contra los protozoos. Por ejemplo, la solicitud de patente EP 47 662 A2 describe una vacuna obtenida a partir de una cepa atenuada de *Eimeria necatrix* que permite tratar las aves de corral contra la coccidiosis.

- 45 La vacuna se puede distribuir en la comida del animal o el agua potable del animal.

Finalmente, las formulaciones a base de activos vegetales permiten actuar contra la coccidiosis en la cría. A este respecto, pueden mencionarse:

- 50
- formulaciones preparadas a base de artemisinina tales como las descritas, por ejemplo, en la solicitud internacional WO 00/04025 A1;
 - formulaciones a base de cáscara de anacardo tales como las descritas, por ejemplo, en la solicitud de patente EP 1103 190 A1;
 - formulaciones a base de taninos hidrolizables tales como las descritas, por ejemplo, en la solicitud internacional
- 55 WO 2014/004761 A2;
- formulaciones a base de sapogeninas tales como las descritas en la solicitud de patente EP 1 082 909 A1;
 - la mezcla que comprende un extracto de semilla de fenogreco, un extracto de eucalipto y un extracto de hojas de boldo como se describe en la solicitud internacional WO 03/055328 A1.

- 60 Debido a los efectos devastadores de las infecciones por coccidiosis mencionados anteriormente, se busca constantemente nuevos coccidiostáticos más eficientes.

Las saponinas son metabolitos secundarios producidos naturalmente por plantas. Las saponinas están presentes con mucha frecuencia en las raíces, tallos, hojas, semillas o frutos de plantas. Se trata de heterósidos complejos

- 65 compuestos por un azúcar asociado a un esteroide, un esteroide alcaloide (es decir, que consta de una función nitrogenada) o un triterpeno. Debido a la diversidad estructural de glúcidos y agliconas, existen numerosas saponinas.

Los inventores de la presente invención han descubierto, de manera bastante sorprendente, que la administración de una formulación que comprende la asociación de las saponinas de dos plantas, que son *Camellia oleifera* y *Trigonella foenum-graecum*, con un compuesto que tiene propiedades antioxidantes en cantidades determinadas tuvo un efecto coccidiostático en los animales, en particular en las aves de corral. En efecto, se ha observado una reducción de las lesiones intestinales y de la excreción de oocistos en pruebas realizadas en el ave de corral. Los inventores han constatado así un efecto sinérgico para el tratamiento o la prevención de la coccidiosis en un ave de corral entre las saponinas de las dos plantas antes mencionadas y un compuesto que tiene propiedades antioxidantes cuando se administraron en cantidades determinadas.

La presente invención se describe a continuación basándose en el ejemplo del ave de corral sin que esto limite su alcance.

La presente invención tiene así como primer objeto un aditivo alimentario destinado a un animal, en particular al ave de corral, que se caracteriza por que comprende, en porcentajes máxicos expresados con respecto a la masa total de dicho aditivo, al menos:

- entre 0,02 % y 10 %, preferentemente entre 0,1 % y 4,5 %, de saponinas de la planta *Camellia oleifera*;
- entre 0,2 % y 19 %, preferentemente entre 0,6 % y 9,5 %, de saponinas de la planta *Trigonella foenum-graecum*;
- y
- entre 1 % y 25 %, preferentemente entre 1 % y 15 %, de un compuesto que tiene propiedades antioxidantes.

El aditivo alimentario de acuerdo con la invención presenta además la ventaja de actuar sobre los rendimientos zootécnicos del animal ya que va a contribuir, mediante la disminución de la infestación debido a los coccidios y la lucha contra el estrés oxidativo, a mantener estos rendimientos.

La *Camellia oleifera* es un árbol originario de China, perteneciente a la familia de las *Theaceae*. La *Camellia oleifera* contiene saponinas en sus semillas, sus hojas, sus tallos y sus raíces.

La *Trigonella foenum-graecum*, también conocida con el nombre de fenogreco, es una planta herbácea de la familia de las *Fabaceae*, y más particularmente de las proteaginosas. La *Trigonella foenum-graecum* contiene saponinas en sus semillas, sus hojas, sus tallos y sus raíces.

Por eso, el aditivo alimentario de acuerdo con la invención puede comprender al menos:

- semillas, hojas, tallos o raíces, tomados solos o en mezclas de los mismos, de *Camellia oleifera* que contienen saponinas;
- semillas, hojas, tallos o raíces, tomados solos o en mezclas de los mismos, de *Trigonella foenum-graecum* que contienen saponinas;
- el compuesto que tiene propiedades antioxidantes.

Las semillas, las hojas, los tallos y las raíces de *Camellia oleifera* y *Trigonella foenum-graecum* pueden estar en forma de polvo.

En un modo de realización de la invención, el aditivo alimentario comprende un extracto de semillas, hojas, tallos o raíces, tomados solos o en mezclas de los mismos, de *Camellia oleifera* que contiene dichas saponinas. El extracto de semillas, hojas, tallos o raíces, tomados solos o en mezclas de los mismos, de *Camellia oleifera* puede estar en forma de polvo.

En un modo de realización de la invención, el aditivo alimentario comprende un extracto de semillas, hojas, tallos o raíces, tomados solos o en mezclas de los mismos, de *Trigonella foenum-graecum*. El extracto de *Trigonella foenum graecum* puede estar en forma de polvo.

Así, en un modo de realización de la invención, el aditivo alimentario comprende:

- un extracto de semillas, hojas, tallos o raíces, tomados solos o en mezclas de los mismos, de *Camellia oleifera* que contiene saponinas;
- un extracto de semillas, hojas, tallos, o raíces, tomados solos o en mezclas de los mismos, de *Trigonella foenum-graecum* que contiene saponinas;
- el compuesto que tiene propiedades antioxidantes.

La obtención de un extracto de una planta (por ejemplo una planta de *Camellia oleifera* o de *Trigonella foenum-graecum*) está perfectamente al alcance del experto en la materia que domine las técnicas de extracción en las plantas, a fin de extraer sustancias activas que incluyan en concreto las saponinas.

Las técnicas de extracción de sustancias activas de plantas comprenden generalmente las siguientes etapas:

- un tratamiento de molienda,
- una extracción con un disolvente, por ejemplo un disolvente polar tal como agua o un alcohol;
- uno o varios lavados, por ejemplo con un disolvente no polar.

5

La extracción de plantas permite disolver las sustancias activas que se contienen en el disolvente. Después de la evaporación del disolvente, se obtiene un extracto de la planta que contiene de forma concentrada las sustancias activas, en concreto las saponinas.

10 En un modo de realización ventajoso de la invención, los extractos de plantas se obtienen de acuerdo con un procedimiento que comprende al menos las siguientes etapas:

- una etapa de maceración de las materias primas de la planta en una solución acuosa que contiene entre 5 % y 80 % en masa de etanol con respecto a la masa total de la solución;
- 15 - una etapa de concentración durante la cual las materias primas se estandarizan en materia seca por secado;
- una etapa de molienda para obtener un extracto de la planta en forma de polvo.

Esta preparación de extractos de plantas presenta la ventaja de mejorar la biodisponibilidad de las sustancias activas que contienen, en concreto, saponinas.

20

En un modo de realización de la invención, el aditivo puede comprender además saponinas que se pueden seleccionar entre las saponinas de las siguientes plantas: *Aesculus hippocastanum*, *Argania spinosa*, *Calendula officinalis*, *Camellia sinensis*, *Chenopodium quinoa*, *Gypsophila paniculata*, *Medicago sativa*, *Melilotus officinalis*, *Primula veris*, *Quillaja saponaria*, *Saponaria officinalis*, *Saponaria vaccaria*, y *Yucca schidigera*, tomadas solas o en mezclas de las mismas.

25

El aditivo alimentario de acuerdo con la invención puede comprender así un extracto de al menos una de estas plantas de modo que contenga de forma concentrada las saponinas de estas plantas.

30 El compuesto que tiene propiedades antioxidantes tiene ventajosamente una actividad antioxidante superior o igual a 2500 mmol trolox/g, siendo dicha actividad antioxidante medida por un método descrito en la publicación titulada "DPPH antioxidant assay revisited" de Om P. Sharma y Tej K. Bhat, Food Chemistry, Volumen 113, n.º 4, 15 de abril de 2009, páginas 1202-1205. "DDPH" es la abreviatura del compuesto químico: 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo.

35 Preferentemente, el compuesto que tiene propiedades antioxidantes tiene una actividad antioxidante comprendida entre 2500 y 25.000 mmol trolox/g, más preferentemente entre 3000 y 10.000 mmol trolox/g.

Ventajosamente, el compuesto que tiene propiedades antioxidantes está contenido en un extracto de planta.

40 En este modo de realización de la invención, el aditivo alimentario puede comprender entre 1 % y 50 %, preferentemente entre 1 % y 25 %, de un extracto de al menos una planta que contiene dicho compuesto que tiene propiedades antioxidantes.

45 El extracto de planta que contiene dicho compuesto que tiene propiedades antioxidantes puede seleccionarse entre los extractos de las plantas de *Castanea sativa*, *Camellia sinensis*, *Rosmarinus officinalis*, *Vitis vinifera*, o incluso *Olea europea*, tomados solos o en mezcla de los mismos.

Así, en un modo de realización de la invención, el aditivo alimentario comprende un extracto de al menos una planta seleccionada entre *Castanea sativa*, *Camellia sinensis*, *Rosmarinus officinalis*, *Vitis vinifera* o de *Olea europea*, tomadas solas o en mezclas de las mismas, y que contiene dicho compuesto que tiene propiedades antioxidantes.

50

De manera preferida, se trata de un extracto de planta de *Castanea sativa*.

55 El compuesto que tiene propiedades antioxidantes permite neutralizar los radicales libres producidos durante un estrés oxidativo, en concreto un estrés oxidativo que tiene como origen la coccidiosis. En efecto, la coccidiosis induce la producción de radicales libres.

En un modo de realización del aditivo alimentario, la relación del porcentaje másico de las saponinas de *Camellia oleifera* al porcentaje másico de las saponinas de *Trigonella foenum-graecum* está comprendida entre 0,02: 19 y 10: 0,2, preferentemente entre 0,1: 9,5 y 4,5: 0,6.

60

En un modo de realización del aditivo alimentario, la relación de la suma de los porcentajes másicos de las saponinas de *Camellia oleifera* y de *Trigonella foenum-graecum* al porcentaje másico del compuesto que tiene propiedades antioxidantes está comprendida entre 0,22: 25 y 29: 1, preferentemente entre 0,7: 15 y 14: 1.

65

Cuando el aditivo alimentario comprende un extracto de semillas, hojas, tallos, o raíces, tomados solos o en mezclas

de los mismos, de *Camellia oleifera*, el extracto comprende entre 1 % y 50 %, preferentemente entre 1 % y 20 %, más preferentemente entre 5 % y 15 %, de saponinas con respecto a la masa total de materia seca de dicho extracto.

- 5 Cuando el aditivo alimentario comprende un extracto de semillas, hojas, tallos, o raíces, tomados solos o en mezclas de los mismos, de *Trigonella foenum-graecum*, el extracto comprende entre 1 % y 20 %, preferentemente entre 1 % y 10 %, de saponinas con respecto a la masa total de materia seca de dicho extracto.

- 10 Para completar el aditivo alimentario en masa al 100 %, puede contener además al menos un compuesto seleccionado entre excipientes tales como la sílice, la arcilla, conservantes, harinas, así como coproductos de cereales (por ejemplo, trigo molido o salvado).

El porcentaje másico de este compuesto puede estar comprendido entre 0,01 % y 75 %, preferentemente entre 0,01 % y 50 %, con respecto a la masa total de dicho aditivo.

- 15 De manera preferida, el aditivo alimentario comprende en porcentajes másicos expresados con respecto a la masa total de dicho aditivo:

- entre 2 % y 50 %, preferentemente entre 2 % y 30 %, de un extracto de semillas, hojas, tallos o raíces, tomados solos o en mezclas de los mismos, de *Camellia oleifera*;
- 20 - entre 20 % y 95 %, preferentemente entre 60 % y 95 %, de un extracto de semillas, hojas, tallos o raíces, tomados solos o en mezclas de los mismos, de *Trigonella foenum-graecum*;
- entre 1 % y 25 %, preferentemente entre 1 % y 15 %, del compuesto que tiene propiedades antioxidantes o entre 1 % y 50 %, preferentemente entre 1 y 25 %, de un extracto de planta que contiene dicho compuesto que tiene propiedades antioxidantes;
- 25 - opcionalmente entre 0,01 % y 75 %, preferentemente entre 0,01 % y 50 %, de compuesto seleccionado entre los excipientes tales como la sílice, la arcilla, los conservantes, las harinas y los coproductos de cereales.

El aditivo alimentario de acuerdo con la invención puede presentarse en forma de gránulos, polvo o mezcla en polvo.

- 30 El aditivo alimentario de la presente invención se puede integrar al alimento de aves de corral a razón de 10 ppm a 1000 ppm, preferentemente a razón de 250 ppm.

- 35 En un modo de realización de la invención, el aditivo alimentario se integra en el alimento del animal a razón de 0,01 a 1,00 kg, preferentemente de 0,10 a 0,50 kg, por tonelada del alimento del animal.

En un modo de realización de la invención, el aditivo alimentario se integra en el alimento a razón de 0,09 a 9,00 g, preferentemente de 0,9 a 4,5 g/100 kg de peso vivo de ave de corral por día (para animales de 1,5 kg de peso vivo que consuman 0,135 kg de alimento completo por día).

- 40 Cuando el aditivo alimentario comprende únicamente compuestos a base de plantas ricas en metabolitos secundarios, entonces es completamente de origen natural y se puede utilizar hasta el sacrificio del animal, sin período de retirada previa necesaria.

- 45 La invención tiene así por objeto un alimento para animal, preferentemente un ave de corral, que se caracteriza por que comprende entre 0,01 y 1,00 kg, preferentemente entre 0,10 y 0,50 kg, de aditivo alimentario tal como se ha descrito anteriormente por tonelada de alimento.

El alimento para animal puede comprender:

- 50 - entre 2,5 y 100 g/tonelada de alimento, preferentemente entre 2,5 y 25 g/tonelada de alimento, de saponinas de *Camellia oleifera* o entre 1 y 2000 g/tonelada de alimento, preferentemente entre 3 y 650 g/tonelada de alimento, de un extracto de *Camellia oleifera*;
- entre 2,5 y 100 g/tonelada de alimento, preferentemente entre 2,5 y 25 g/tonelada de alimento, de saponinas de *Trigonella foenum-graecum* o entre 25 y 10.000 g/tonelada de alimento, preferentemente entre 25 y 500 g/tonelada
- 55 de alimento, de un extracto de *Trigonella foenum-graecum*;
- entre 1 y 25 g/tonelada de alimento, preferentemente entre 1 y 15 g/tonelada de alimento, del compuesto que tiene propiedades antioxidantes o entre 1 y 100 g/tonelada de alimento, preferentemente entre 1 y 50 g/tonelada de alimento, de un extracto de una planta que contiene dicho compuesto que tiene propiedades antioxidantes.

- 60 Habida cuenta de su propiedad anticoccidiana, el aditivo alimentario de la invención se puede incorporar a la composición de un alimento de un animal (preferentemente un ave de corral) que está destinado a tener una acción coccidiostática. El aditivo alimentario va a poder actuar sobre determinados factores de riesgo de la enfermedad puesta de manifiesto como el estado inmunitario del animal y el estrés oxidativo gracias al compuesto con propiedades antioxidantes. Otro factor de riesgo identificado es la presencia de alimentos denominados como "favorecedores" de
- 65 la coccidiosis en la ración alimenticia del animal. Puede tratarse de dietas ricas en proteínas y/o que pueden comprender ácidos grasos esenciales, vitamina B y D o incluso calcio (si su contenido másico en la ración es superior

a 1 %). El aporte del aditivo alimentario sirve para contrarrestar la presencia de estos componentes de riesgo.

El aditivo alimentario también se puede utilizar con el objetivo de actuar directamente sobre el desarrollo de los coccidios, o incluso sobre la alteración de la mucosa intestinal, sobre la excreción de ooquistes y, por tanto, sobre la recontaminación del entorno, y finalmente sobre la disminución de los rendimientos zootécnicos.

La invención tiene también por objeto el aditivo alimentario o el alimento tales como los descritos anteriormente para el tratamiento preventivo o curativo de la coccidiosis, preferentemente la coccidiosis de un ave de corral.

La invención se comprenderá mejor con la ayuda de la descripción detallada de los experimentos que se exponen a continuación con referencia al dibujo adjunto que representa los resultados de los datos experimentales relativos a la administración a los animales de alimentos de acuerdo con la invención y de alimentos comparativos.

Descripción de las figuras

La figura 1 representa un gráfico en donde se detallan los porcentajes relativos de mejora del índice de consumo que se determinaron con diversos ensayos realizados a pollos a los que se les administró diferentes alimentos a base de extractos de *Trigonella foenum-graecum* y *Camellia oleifera*.

La figura 2 representa un gráfico que representa las puntuaciones de lesiones causadas por 3 especies del parásito *Eimeria* en 5 lotes de pollos a los que se les administró diferentes alimentos.

La figura 3 representa un gráfico que representa las puntuaciones de lesiones causadas por 3 especies del parásito *Eimeria* en 5 lotes de pollos a los que se les administró diferentes alimentos.

PARTE EXPERIMENTAL

I - Efecto sinérgico de la asociación de *Camellia oleifera* y de *Trigonella foenum-graecum* sobre el índice de consumo de pollos infectados por coccidiosis

Los resultados que se presentan a continuación se obtuvieron mediante síntesis de los resultados de 4 ensayos experimentales que se detallan a continuación.

Ensayo N.º 1:

Los animales de experimentación utilizados para realizar el ensayo n.º 1 fueron pollos de engorde. Fueron objeto de estudio 224 pollos de raza Cobb 500.

Se establecieron los siguientes 2 lotes de control:

- 1^{er} lote de control T1: un grupo de 56 pollos que no fueron infectados por coccidiosis.
- 2^o lote de control T2: un grupo de 56 pollos que fueron infectados por los coccidios *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* y *Eimeria tenella*.

Por otro lado, se han establecido los siguientes lotes A y B:

- Lote A: un grupo de 56 pollos que habían sido todos infectados por los coccidios *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* y *Eimeria tenella*, y a los que se les administró diariamente un extracto de *Camellia oleifera* integrado en el alimento de hasta 0,25 kg/tonelada durante 20 días;
- Lote B: un grupo de 56 pollos que habían sido todos infectados por los coccidios *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* y *Eimeria tenella*, y a los que se les administró diariamente un extracto de *Trigonella foenum-graecum* integrado en el alimento de hasta 0,25 kg/tonelada durante 20 días.

Ensayo N.º 2:

Los animales de experimentación tomados en cuenta para la realización de la síntesis de los resultados son únicamente los dos grupos de control para este ensayo n.º 2. Fueron objeto de estudio 96 pollos de raza Ross 308.

Se establecieron los siguientes 2 lotes de control:

- 1^{er} lote de control T1: un grupo de 48 pollos que no fueron infectados por coccidiosis.
- 2^o lote de control T2: un grupo de 48 pollos que fueron infectados por los coccidios *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* y *Eimeria tenella*.

Ensayo N.º 3:

Los animales de experimentación utilizados para realizar el ensayo n.º 3 fueron pollos de engorde. Fueron objeto de estudio 392 pollos de raza Cobb 500.

Se establecieron los siguientes 2 lotes de control:

- 5
- 1^{er} lote de control T1: un grupo de 56 pollos que no fueron infectados por coccidiosis.
 - 2º lote de control T2: un grupo de 56 pollos que fueron infectados por los coccidios *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* y *Eimeria tenella*.

10 Por otro lado, se han establecido los siguientes lotes A a E:

- Lote A: un grupo de 56 pollos que habían sido todos infectados por los coccidios *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* y *Eimeria tenella*, y a los que se les administró diariamente un extracto de *Camellia oleifera* integrado en el alimento de hasta 0,25 kg/tonelada durante 20 días;
- 15 - Lote B: un grupo de 56 pollos que habían sido todos infectados por los coccidios *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* y *Eimeria tenella*, y a los que se les administró diariamente un extracto de *Trigonella foenum-graecum* integrado en el alimento de hasta 0,25 kg/tonelada durante 20;
- Lote C: un grupo de 56 pollos que habían sido todos infectados por los coccidios *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* y *Eimeria tenella*, y a los que se les administró diariamente durante 20 días:
 - 20 ◦ un extracto de *Camellia oleifera* integrado en el alimento de hasta 0,1875 kg/tonelada.
 - un extracto de *Trigonella foenum-graecum* integrado en el alimento de hasta 0,0625 kg/tonelada.
 - La relación de la cantidad de *Camellia oleifera* a la de *Trigonella foenum-graecum* fue de 3: 1;
- 25 - Lote D: un grupo de 56 pollos que habían sido todos infectados por los coccidios *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* y *Eimeria tenella*, y a los que se les administró diariamente durante 20 días:
 - un extracto de *Camellia oleifera* integrado en el alimento de hasta 0,125 kg/tonelada.
 - un extracto de *Trigonella foenum-graecum* integrado en el alimento de hasta 0,125 kg/tonelada.
 - 30 La relación de la cantidad de *Camellia oleifera* a la de *Trigonella foenum-graecum* fue de 1:1;
- Lote E: un grupo de 56 pollos que habían sido todos infectados por los coccidios *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* y *Eimeria tenella*, y a los que se les administró diariamente durante 20 días:
 - 35 ◦ un extracto de *Camellia oleifera* integrado en el alimento de hasta 0,0625 kg/tonelada.
 - un extracto de *Trigonella foenum-graecum* integrado en el alimento de hasta 0,1875 kg/tonelada.
 - La relación de la cantidad de *Camellia oleifera* a la de *Trigonella foenum-graecum* fue de 1: 3.

Ensayo N.º 4:

40 Los animales de experimentación utilizados para realizar el ensayo n.º 4 fueron pollos de engorde. Fueron objeto de estudio 336 pollos de raza Ross 308.

Se establecieron los siguientes 2 lotes de control:

- 45
- 1^{er} lote de control T1: un grupo de 48 pollos que no fueron infectados por coccidiosis.
 - 2º lote de control T2: un grupo de 48 pollos que fueron infectados por los coccidios *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* y *Eimeria tenella*.

50 Por otro lado, se han establecido los siguientes lotes A a E:

- Lote A: un grupo de 48 pollos que habían sido todos infectados por los coccidios *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* y *Eimeria tenella*, y a los que se les administró diariamente un extracto de *Camellia oleifera* integrado en el alimento de hasta 0,25 kg/tonelada durante 20 días;
- 55 - Lote B: un grupo de 48 pollos que habían sido todos infectados por los coccidios *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* y *Eimeria tenella*, y a los que se les administró diariamente un extracto de *Trigonella foenum-graecum* integrado en el alimento de hasta 0,25 kg/tonelada durante 20;
- Lote C: un grupo de 48 pollos que habían sido todos infectados por los coccidios *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* y *Eimeria tenella*, y a los que se les administró diariamente durante 20 días:
 - 60 ◦ un extracto de *Camellia oleifera* integrado en el alimento de hasta 0,1875 kg/tonelada.
 - un extracto de *Trigonella foenum-graecum* integrado en el alimento de hasta 0,0625 kg/tonelada.
 - La relación de la cantidad de *Camellia oleifera* a la de *Trigonella foenum-graecum* fue de 3: 1;
- 65 - Lote D: un grupo de 48 pollos que habían sido todos infectados por los coccidios *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* y *Eimeria tenella*, y a los que se les administró diariamente durante 20 días:

- un extracto de *Camellia oleifera* integrado en el alimento de hasta 0,125 kg/tonelada.
 - un extracto de *Trigonella foenum-graecum* integrado en el alimento de hasta 0,125 kg/tonelada.
- La relación de la cantidad de *Camellia oleifera* a la de *Trigonella foenum-graecum* fue de 1:1;

- Lote E: un grupo de 48 pollos que habían sido todos infectados por los coccidios *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima* y *Eimeria tenella*, y a los que se les administró diariamente durante 20 días:

- un extracto de *Camellia oleifera* integrado en el alimento de hasta 0,0625 kg/tonelada.
 - un extracto de *Trigonella foenum-graecum* integrado en el alimento de hasta 0,1875 kg/tonelada.
- La relación de la cantidad de *Camellia oleifera* a la de *Trigonella foenum-graecum* fue de 1: 3.

La inoculación por los coccidios tuvo lugar el día 14 para los ensayos n.º 1 y 3 y el día 16 para los ensayos n.º 2 y 4.

El índice de consumo se midió durante el período comprendido entre el día 14 y el 20 de ensayo. Corresponde a la relación entre la cantidad de alimento consumido y el aumento de peso del animal.

Para cada uno de los lotes detallados anteriormente, y para los 4 ensayos, se calculó el porcentaje relativo de aumento del índice de consumo con respecto al control T1 (no infectado) en el período del día 14 al 20 de ensayo. El promedio de estos porcentajes relativos se calculó para los grupos que recibieron el mismo tratamiento, todos los ensayos combinados. A continuación, se obtuvo un porcentaje relativo promedio de aumento del índice de consumo con respecto al control T1 para cada uno de los tratamientos analizados. Estos se presentan en el gráfico que constituye la figura 1.

Se observa que la infección de los animales del grupo de Control T2 provoca un aumento del índice de consumo de 87,32 % con respecto al Control T1.

Este aumento se ve atenuado por las diferentes administraciones de *Camellia oleifera* y *Trigonella foenum-graecum* que se analizaron en los lotes de pollos A a E.

Cabe señalar entonces que la administración sola de *Camellia oleifera* o de *Trigonella foenum-graecum* reduce muy poco el índice de consumo que se incrementó debido a la infección de las aves de corral por el parásito *Eimeria*.

Con una administración sola de *Camellia oleifera*, se observa un aumento de 83,07 % del índice de consumo. Esto significa que esta administración permite solamente reducir el índice de consumo en un 4,25 % con respecto al control T2.

Asimismo, con una administración sola de *Trigonella foenum-graecum*, se observa un aumento de 84,62 % del índice de consumo con respecto al Control T1. Esto significa que esta administración permitió reducir el índice de consumo en un 2,70 % con respecto al Control T2.

Sin embargo, si nos interesamos por los efectos de la asociación de las dos plantas para los lotes C a E, se observa un efecto sinérgico de esta asociación que es beneficiosa, ya que limita de manera más significativa el aumento del índice de consumo en animales infectados, independientemente de la relación.

En efecto, el índice de consumo para los pollos de los lotes C a E a los que se les administró las plantas *Camellia oleifera* y *Trigonella foenum-graecum* aumentó respectivamente en un 40,83 %, 33,66 % y 28,33 % con respecto al control T1. Este es mucho más bajo que para los pollos de los lotes A y B. Las reducciones del índice de consumo inducidas por la administración combinada de *Camellia oleifera* y *Trigonella foenum-graecum* son respectivamente de 46,49 %, 53,66 % y 58,99 % con respecto al control T2.

Este experimento demostró el efecto sinérgico entre *Camellia oleifera* y *Trigonella foenum-graecum*, es decir, el efecto de la asociación de estas dos plantas es mayor que la suma de los efectos individuales de cada una de estas plantas.

II - Mejora de la capacidad hemolítica por la asociación de *Camellia oleifera* y *Trigonella foenum-graecum*

Una segunda prueba realizada *in vitro* sobre la capacidad hemolítica de las plantas *Camellia oleifera* y *Trigonella foenum-graecum* permitió confirmar la presencia de un efecto sinérgico entre estas dos plantas.

La prueba de capacidad hemolítica consiste en poner en contacto muestras de *Camellia oleifera* y *Trigonella foenum-graecum* con una solución de hematíes a fin de observar la capacidad de lisis de los hematíes de la muestra analizada.

De este ensayo se deduce una dosis hemolítica "DH50" que es la dosis que permite lisar el 50 % de los hematíes de solución.

Esta prueba permite medir el efecto de un activo sobre la membrana celular de glóbulos rojos que tienen una estructura

similar a la membrana celular de los coccidios. En efecto, la membrana de los glóbulos rojos al igual que la de los coccidios consta de esteroides sobre los que se fija el activo analizado (por ejemplo, las saponinas analizadas); lo que conlleva a una desestabilización membranaria, y luego a una lisis celular. Por eso, la capacidad hemolítica de un activo analizado (por ejemplo, las saponinas analizadas) se correlaciona con su capacidad coccidiolítica.

5 Primero se determinó la DH50 de plantas solas, luego las DH50 de asociaciones de las dos plantas de acuerdo con las relaciones (tales como las detalladas en la tabla 1 a continuación) de la masa de *Camellia oleifera* a la de *Trigonella foenum-graecum* fueron calculadas teóricamente antes de ser determinadas también.

10 Para cada una de las relaciones, la DH50 teórica se calculó a partir de las DH50 determinadas para cada planta sola, en función de sus regresiones lineales y de sus rendimientos de extracción respectivos.

La tabla 1 detalla los datos de DH50 calculada y observada en función de la relación considerada.

15 *Tabla 1 que detalla los datos de DH50 teórica y observada en función de la relación considerada*

	DH50 (mg/ml) teórica	DH50 (mg/ml) observada	Diferencia entre DH50 teórica y DH50 observada (%)
Relación = 1	2300	734	-68,09 %
Relación = 2	1560	483	-69,04 %
Relación = 3	935	371	-60,32 %

Se observa que para cada una de las relaciones analizadas, la DH50 teórica es mucho más elevada que la DH50 observada.

20 En efecto, para la relación 1, se observa que la DH50 medida durante la prueba es un 68,09 % más baja con respecto a la DH50 teórica. Para la relación 2, es menor en un 69,04 % y para la relación 3, es menor en un 60,32 %.

El hecho de que las DH50 observadas sean inferiores a las DH50 teóricas significa que la asociación de las dos plantas *Camellia oleifera* y *Trigonella foenum-graecum* presenta una eficacia superior a la esperada de acuerdo con los cálculos teóricos.

25

Este experimento también confirma que la asociación de estas dos plantas tiene un efecto sinérgico.

30 III - Efecto sinérgico de la asociación de *Camellia oleifera*, *Trigonella foenum-graecum* y *Castanea sativa* sobre las puntuaciones de lesiones de pollos infectados por coccidiosis

Como se ha explicado anteriormente, la gravedad de la coccidiosis se mide por la importancia de las lesiones a nivel intestinal. En efecto, las lesiones de la pared del tracto digestivo son consecutivas al ciclo de desarrollo intracelular del parásito.

35 El ooquiste es una forma de resistencia del parásito cuando se encuentra en la atmósfera libre. Después de la ingestión de ooquistes, los pollos van a contraer la enfermedad ya que el parásito se multiplicará dentro de su huésped, luego el pollo liberará ooquistes en los excrementos que van a contaminar a otros pollos.

40 Ensayo N.º 5:

Los animales de experimentación utilizados para realizar el ensayo n.º 5 fueron pollos de engorde. Fueron objeto de estudio 500 pollos de raza Cobb 500.

45 Se establecieron los siguientes 2 lotes de control:

- 1^{er} lote de control T1: un grupo de 100 pollos que no fueron infectados por coccidiosis.
- 2^o lote de control T2: un grupo de 100 pollos que fueron infectados por los coccidios *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima*, *Eimeria tenella*.

50 Por otro lado, se han establecido los siguientes lotes A, B y C:

- Lote A: un grupo de 100 pollos que habían sido todos infectados por los coccidios *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima*, *Eimeria tenella*, y a los que se les administró diariamente durante 20 días:

- un extracto de *Trigonella foenum-graecum* integrado en el alimento de hasta 0,240 kg/tonelada;
- un extracto de *Castanea sativa* integrado en el alimento de hasta 0,010 kg/tonelada.

55

- Lote B: un grupo de 100 pollos que habían sido todos infectados por los coccidios *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima*, *Eimeria tenella*, y a los que se les administró diariamente durante 20 días una mezcla de extractos de *Trigonella foenum-graecum* y de *Yucca schidigera* e integrada al alimento de hasta 0,250 kg/tonelada, 11,25 g de saponinas/tonelada de alimento. En esta mezcla: el 45 % de las saponinas totales fueron aportadas por el extracto de *Trigonella foenum-graecum* y el 55 % de las saponinas totales fueron aportadas por el extracto de *Yucca schidigera*.
- Lote C: un grupo de 100 pollos que habían sido todos infectados por los coccidios *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima*, *Eimeria tenella*, y a los que se les administró diariamente durante 20 días:
 - o un extracto de *Trigonella foenum-graecum* integrado en el alimento de hasta 0,190 kg/tonelada;
 - o un extracto de *Camellia oleifera* integrado en el alimento de hasta 0,050 kg/tonelada;
 - o Un extracto de *Castanea sativa* integrado en el alimento de hasta 0,010 kg/tonelada.

Así, a los lotes A y B se les administró un alimento comparativo y al lote C un alimento de acuerdo con la invención.

En cuanto a la infección del 2º lote de control T2 y de los lotes A a C, la inoculación por los coccidios tuvo lugar en el día 14 mediante alimentación por sonda oral de los pollos con una vacuna viva (Coccivac®-B52 comercializada por la sociedad Merck) tres veces la dosis normal.

Para cada uno de los 5 lotes, los 100 pollos fueron distribuidos por decenas en 10 jaulas.

En el día 21, se realizó un conteo de las lesiones.

Para conseguirlo, se seleccionaron aleatoriamente 3 pollos de cada jaula para ser eutanasiados a fin de indicar las lesiones típicas para la coccidiosis de acuerdo con el método detallado en la publicación titulada "Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens" de J. Johnson y WM Reid, Exp Parasitol. agosto de 1970; 28(1), páginas 30-36, con una puntuación que va de 0 (sin lesiones) a 4 (lesiones graves).

La calificación de las lesiones es una evaluación de la patología macroscópica y de los daños físicos causados por el parásito.

Los resultados se analizaron mediante análisis de varianza ANOVA. Las diferencias se consideraron significativas cuando p fue inferior a 0,05 (con un intervalo de confianza del 95 %).

La tabla 2 a continuación detalla para los 5 lotes las puntuaciones de lesiones en el día 21 que fueron causadas por las siguientes 3 especies del parásito *Eimeria*: *Eimeria acervulina*, *Eimeria tenella* y *Eimeria maxima*.

Tabla 2 que detalla las lesiones en el día 21 para los 5 lotes del ensayo n.º 5

	Lote T1	Lote T2	Lote A	Lote B	Lote C
<i>Eimeria acervulina</i>	0,778 ^a	1,833 ^b	1,433 ^{ab}	1,567 ^{ab}	1,133 ^{ab}
<i>Eimeria maxima</i>	0,370 ^a	1,500 ^b	1,000 ^{ab}	1,100 ^{ab}	0,600 ^e
<i>Eimeria tenella</i>	0,370 ^a	1,100 ^b	0,533 ^{ab}	0,633 ^{ab}	0,433 ^a

La figura 2 es un gráfico que representa las puntuaciones de lesiones causadas por las 3 especies de parásito *Eimeria* antes mencionadas en los Lotes T1, T2 y A a C.

La provocación voluntaria de la coccidiosis en los animales del lote T2 funcionó bien ya que se constataron puntuaciones de lesiones para estos animales que fueron significativamente superiores a las de los animales sanos del lote de control T1. Esto significa que efectivamente se han enfermado.

Efecto sobre las lesiones por *Eimeria acervulina*:

Independientemente de la mezcla de extractos de plantas administrada, se observa una mejora numérica de las puntuaciones de lesiones para los lotes A a C. Sin embargo, el efecto es más pronunciado para el lote C al que se le administró el alimento de acuerdo con la invención, a saber, el alimento que comprende un extracto de *Trigonella foenum-graecum*, un extracto de *Camellia oleifera* y un extracto de *Castanea sativa*.

Efecto sobre las lesiones por *Eimeria maxima* y *tenella*:

Cuando los animales recibieron la mezcla compuesta por un compuesto de *Trigonella foenum-graecum* y por un extracto de *Castanea sativa* (a saber, los animales del Lote A) o la mezcla compuesta por un extracto de *Trigonella foenum-graecum* y por un extracto de *Yucca schidigera* (a saber, los animales del Lote B), no se observó ninguna mejora significativa. En otras palabras, no se constató una mejoría en las puntuaciones de lesiones para los animales de los Lotes A y B a los que se les administró los alimentos comparativos.

Por el contrario, se identifica que para los animales del Lote C a los que se les administró un alimento de acuerdo con la invención, las puntuaciones de lesiones se redujeron significativamente. Se identifica en efecto valores de las puntuaciones de lesiones al mismo nivel que los del lote de control T1 (a saber, el lote de los animales que estaban sanos puesto que no se les inocularon coccidios).

5 Así, este experimento demuestra claramente el efecto sinérgico entre los extractos de las dos plantas que son *Trigonella foenum-graecum*, *Camellia oleifera*, así como un extracto de la planta *Castanea sativa* que contiene compuestos que tienen propiedades antioxidantes para tratar la coccidiosis.

10 Este efecto sinérgico no se observó para los alimentos comparativos que contenían:

- un extracto de una de las dos plantas antes mencionadas (a saber, *Trigonella foenum-graecum*) en asociación con el extracto de la planta *Castanea sativa* - por tanto, este alimento comparativo carecía de extracto de *Camellia oleifera*;
- 15 - un extracto de una de las dos plantas mencionadas (a saber, *Trigonella foenum-graecum*) en asociación con un extracto de otra planta *Yucca schidigera* - por tanto, este alimento comparativo carecía de extracto de *Camellia oleifera* y de extracto de planta que contenía un compuesto que tiene propiedades antioxidantes.

Ensayo N.º 6:

20 Los animales utilizados para realizar el ensayo n.º 6 fueron pollos de engorde. Fueron objeto de estudio 240 pollos de raza ROSS 308.

Se establecieron los siguientes 2 lotes de control:

- 25 - 1^{er} lote de control T1: un grupo de 48 pollos que no fueron infectados por coccidiosis.
- 2^o lote de control T2: un grupo de 48 pollos que fueron infectados por los coccidios *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima*, *Eimeria tenella*.

30 Por otro lado, se han establecido los siguientes lotes A, B y C:

- Lote A: un grupo de 48 pollos que habían sido todos infectados por los coccidios *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima*, *Eimeria tenella*, y a los que se les administró diariamente un extracto de *Camellia oleifera* integrado en el alimento de hasta 0,25 kg/tonelada durante 22 días;
- 35 - Lote B: un grupo de 48 pollos que habían sido todos infectados por los coccidios *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima*, *Eimeria tenella*, y a los que se les administró diariamente un extracto de *Trigonella foenum-graecum* integrado en el alimento de hasta 0,25 kg/tonelada durante 22 días;
- Lote C: un grupo de 48 pollos que habían sido todos infectados por los coccidios *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima*, *Eimeria tenella*, y a los que se les administró diariamente durante 22 días una mezcla de extractos de *Trigonella foenum-graecum* y de *Yucca schidigera* e integrada al alimento de hasta 0,250 kg/tonelada, 11,25 g de saponinas/tonelada de alimento. En esta mezcla: el 45 % de las saponinas totales fueron aportadas por el extracto de *Trigonella foenum-graecum* y el 55 % de las saponinas totales fueron aportadas por el extracto de *Yucca schidigera*.

45 En cuanto a la infección del 2^o lote de control T2 y de los lotes A a C, la inoculación por los coccidios tuvo lugar en el día 16 mediante inoculación oral de 0,5 ml con un inóculo que contenía ooquistes de *Eimeria maxima*, *tenella* y *acervulina*.

Para cada uno de los 5 lotes, los 48 pollos fueron distribuidos por 8 en 6 jaulas.

50 En el día 22, se realizó un conteo de las lesiones.

Para conseguirlo, se seleccionaron aleatoriamente 5 pollos de cada jaula para ser eutanasiados a fin de indicar las lesiones típicas para la coccidiosis como se ha descrito anteriormente en el ensayo n.º 5.

55 La tabla 3 a continuación detalla para los 5 lotes las puntuaciones de lesiones en el día 22 que fueron causadas por las siguientes 3 especies del parásito Emeiria: *Eimeria acervulina*, *Eimeria tenella* y *Eimeria maxima*.

Tabla 3 que detalla las lesiones en el día 22 para los 5 lotes del ensayo n.º 5

	Lote T1	Lote T2	Lote A	Lote B	Lote C
<i>Eimeria acervulina</i>	0,13 ^b	1,77 ^a	1,90 ^a	1,63 ^a	1,30 ^a
<i>Eimeria maxima</i>	0,03 ^b	1,80 ^a	1,87 ^a	1,17 ^a	1,43 ^a
<i>Eimeria tenella</i>	0,03 ^b	1,83 ^a	1,40 ^a	1,10 ^a	1,10 ^a

La figura 3 es un gráfico que representa las puntuaciones de lesiones causadas por las 3 especies de parásito *Eimeria* antes mencionadas en los Lotes T1, T2 y A a C.

- 5 La provocación voluntaria de la coccidiosis en los animales del lote T2 funcionó bien ya que se constataron puntuaciones de lesiones para estos animales que fueron significativamente superiores a las de los animales sanos del lote de control T1. Esto significa que efectivamente se han enfermado.

Efecto de *Camellia oleifera* (Lote A):

- 10 La administración del extracto de *Camellia oleifera* solo no tuvo ningún efecto sobre las puntuaciones de lesiones relacionadas con *Eimeria acervulina* y *Eimeria maxima*. Se constató una ligera reducción numérica de las lesiones provocadas por *Eimeria tenella*, pero sin que ello sea significativo.

Efecto de *Trigonella foenum-graecum* (Lote B):

- 15 La administración del extracto de *Trigonella foenum-graecum* solo no tuvo ningún efecto sobre las puntuaciones de lesiones relacionadas con *Eimeria acervulina*. Se constató una ligera reducción numérica de las lesiones provocadas por *Eimeria tenella* y *Eimeria maxima*, pero sin que ello sea significativo.

Efecto de *Trigonella foenum-graecum* y *Yucca schidigera* (Lote C):

- 20 La asociación de extractos de *Trigonella foenum-graecum* y de *Yucca schidigera* permitió una ligera reducción de las puntuaciones de lesiones, sea cual sea la cepa, pero sin que ello sea significativo.

25 Este experimento realizado con alimentos comparativos mostró que la administración de un solo extracto de *Camellia oleifera* o de *Trigonella foenum-graecum* o la asociación de uno de estos extractos (a saber, el extracto de *Trigonella foenum-graecum*) con el extracto de otra planta que es *Yucca schidigera* no permite tratar adecuadamente la coccidiosis.

REIVINDICACIONES

1. Aditivo alimentario destinado a un animal, en particular al ave de corral, **caracterizado por que** comprende, en porcentajes máxicos expresados con respecto a la masa total de dicho aditivo, al menos:

- entre 0,02 % y 10 %, preferentemente entre 0,1 % y 4,5 %, de saponinas de la planta *Camellia oleifera*
- entre 0,2 % y 19 %, preferentemente entre 0,6 % y 9,5 %, de saponinas de la planta *Trigonella foenum-graecum*, y
- entre 1 % y 25 %, preferentemente entre 1 % y 15 %, de un compuesto que tiene propiedades antioxidantes.

2. Aditivo alimentario de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el aditivo alimentario comprende:

- semillas, hojas, tallos o raíces, tomados solos o en mezclas de los mismos, de *Camellia oleifera* que contienen saponinas;
- semillas, hojas, tallos o raíces, tomados solos o en mezclas de los mismos, de *Trigonella foenum-graecum* que contienen saponinas;
- el compuesto que tiene propiedades antioxidantes.

3. Aditivo alimentario de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el aditivo alimentario comprende:

- un extracto de semillas, hojas, tallos o raíces, tomados solos o en mezclas de los mismos, de *Camellia oleifera* que contiene saponinas;
- un extracto de semillas, hojas, tallos, o raíces, tomados solos o en mezclas de los mismos, de *Trigonella foenum-graecum* que contiene saponinas;
- el compuesto que tiene propiedades antioxidantes.

4. Aditivo alimentario de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** el compuesto que tiene propiedades antioxidantes tiene una actividad antioxidante superior o igual a 2500 mmol trolox/g, siendo dicha actividad antioxidante medida por el método descrito en la publicación titulada "DPPH antioxidant assay revisited" de Om P. Sharma y Tej K. Bhat, Food Chemistry, Volumen 113, n.º 4, 15 de abril de 2009, páginas 1202-1205.

5. Aditivo alimentario de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado por que** el compuesto que tiene propiedades antioxidantes tiene una actividad antioxidante comprendida entre 2500 mmol/ y 25.000 mmol trolox/g.

6. Aditivo alimentario de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado por que** el aditivo alimentario comprende 1 % y 50 %, preferentemente entre 1 % y 25 %, de un extracto de al menos una planta que contiene dicho compuesto que tiene propiedades antioxidantes.

7. Aditivo alimentario de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado por que** el extracto de planta que contiene dicho compuesto que tiene propiedades antioxidantes puede seleccionarse entre los extractos de las plantas de *Castanea sativa*, *Camellia sinensis*, *Rosmarinus officinalis*, *Vitis vinifera* y de *Olea europea*, tomados solos o en mezclas de los mismos.

8. Aditivo alimentario de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado por que** el extracto de planta es un extracto de *Castanea sativa*.

9. Aditivo alimentario de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado por que** la relación del porcentaje máxico de las saponinas de *Camellia oleifera* al porcentaje máxico de las saponinas de *Trigonella foenum-graecum* está comprendida entre 0,02: 19 y 10: 0,2, preferentemente entre 0,1: 9,5 y 4,5: 0,6.

10. Aditivo alimentario de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado por que** la relación de la suma de los porcentajes máxicos de las saponinas de *Camellia oleifera* y de *Trigonella foenum-graecum* al porcentaje máxico del compuesto que tiene propiedades antioxidantes está comprendida entre 0,22: 25 y 29: 1, preferentemente entre 0,7: 15 y 14: 1.

11. Aditivo alimentario de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, **caracterizado por que** comprende en porcentajes máxicos expresados con respecto a la masa total de dicho aditivo:

- entre 2 % y 50 %, preferentemente entre 2 % y 30 %, de un extracto de semillas, hojas, tallos, o raíces, tomados solos o en mezclas de los mismos, de *Camellia oleifera*;
- entre 20 % y 95 %, preferentemente entre 60 % y 95 %, de un extracto de semillas, hojas, tallos, o raíces, tomados solos o en mezclas de los mismos, de *Trigonella foenum-graecum*;
- entre 1 % y 25 %, preferentemente entre 1 % y 15 %, del compuesto que tiene propiedades antioxidantes o entre 1 % y 50 %, preferentemente entre 1 y 25 %, de un extracto de planta que contiene dicho compuesto que tiene propiedades antioxidantes;

- opcionalmente entre 0,01 % y 75 %, preferentemente entre 0,01 % y 50 %, de compuesto seleccionado entre los excipientes tales como la sílice, la arcilla, los conservantes, las harinas y los coproductos de cereales.

- 5 12. Aditivo alimentario de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado por que** comprende además saponinas seleccionadas entre las saponinas de las plantas *Aesculus hippocastanum*, *Argania spinosa*, *Calendula officinalis*, *Camellia sinensis*, *Chenopodium quinoa*, *Gypsophila paniculata*, *Medicago sativa*, *Melilotus officinalis*, *Primula veris*, *Quillaja saponaria*, *Saponaria officinalis*, *Saponaria vaccaria* y *Yucca schidigera*, tomadas solas o en mezclas de las mismas.
- 10 13. Alimento para animal, preferentemente un ave de corral, **caracterizado por que** comprende entre 0,01 y 1,00 kg, preferentemente entre 0,10 y 0,50 kg, de aditivo alimentario de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 por tonelada de alimento.
- 15 14. Alimento para animal de acuerdo con la reivindicación 13, **caracterizado por que** comprende:
- 20 - entre 2,5 y 100 g/tonelada de alimento, preferentemente entre 2,5 y 25 g/tonelada de alimento de saponinas de *Camellia oleifera* o entre 1 y 2000 g/tonelada de alimento, preferentemente entre 3 y 650 g/tonelada de alimento, de un extracto de *Camellia oleifera*;
- entre 2,5 y 100 g/tonelada de alimento, preferentemente entre 2,5 y 25 g/tonelada de alimento de saponinas de *Trigonella foenum-graecum* o entre 25 y 10.000 g/tonelada de alimento, preferentemente entre 25 y 500 g/tonelada de alimento, de un extracto de *Trigonella foenum-graecum*;
- 25 - entre 1 y 25 g/tonelada de alimento, preferentemente entre 1 y 15 g/tonelada de alimento, del compuesto que tiene propiedades antioxidantes o entre 1 y 100 g/tonelada de alimento, preferentemente entre 1 y 50 g/tonelada de alimento, de un extracto de una planta que contiene dicho compuesto que tiene propiedades antioxidantes.
- 30 15. Aditivo alimentario de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o alimento de acuerdo con la reivindicación 13 o 14 para su uso para el tratamiento preventivo o curativo de la coccidiosis, preferentemente la coccidiosis de un ave de corral.

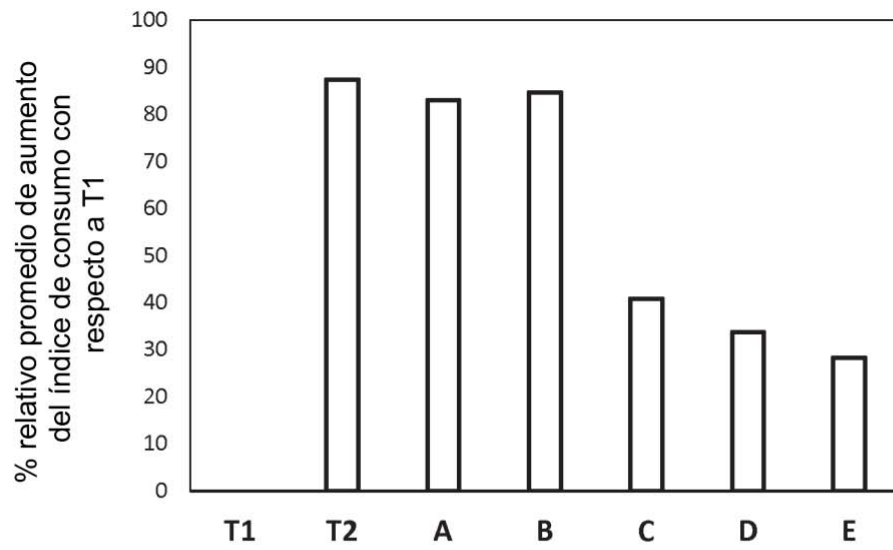


FIG. 1

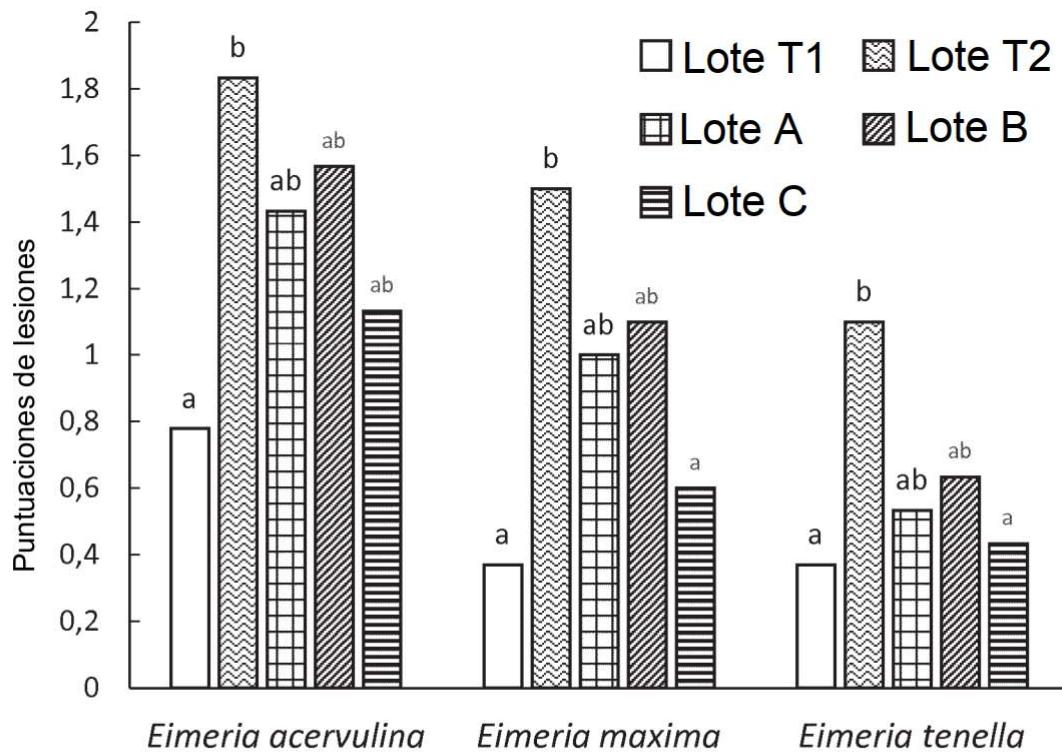


FIG. 2

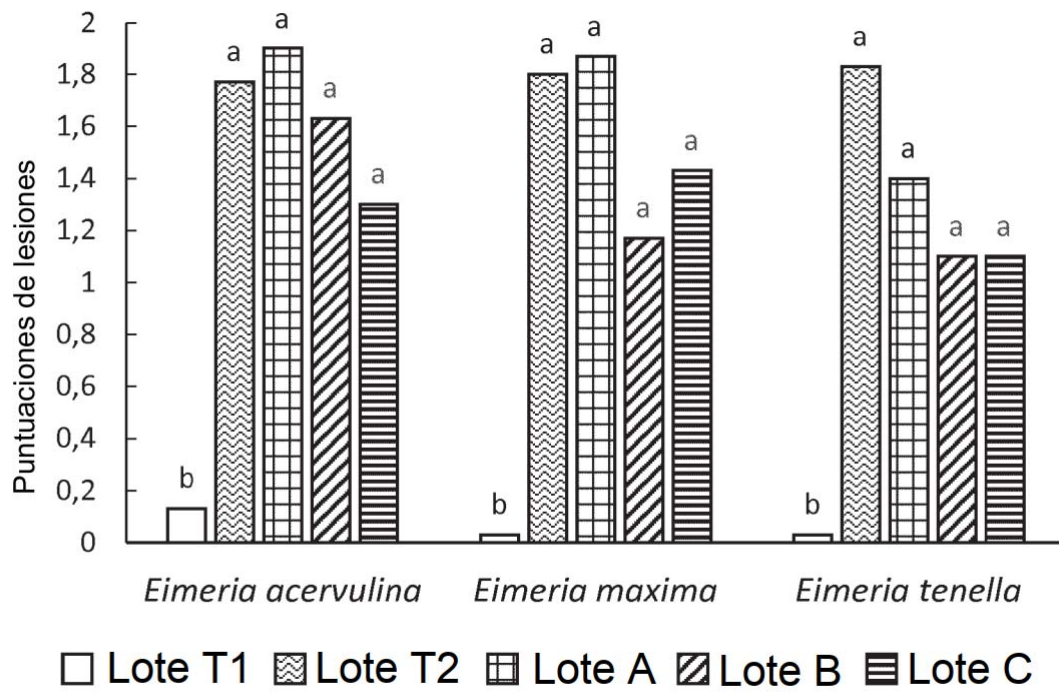


FIG. 3