

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 443 991**

51 Int. Cl.:

A23K 1/16 (2006.01)

A23K 1/18 (2006.01)

A61K 31/185 (2006.01)

A61K 36/185 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2003 E 03770453 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2013 EP 1542543**

54 Título: **Ácidos del lúpulo en sustitución de antibióticos en la alimentación animal**

30 Prioridad:

23.09.2002 US 413246 P

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

21.02.2014

73 Titular/es:

**JOHN I. HAAS, INC. (100.0%)
5185 MACARTHUR BLVD NW, SUITE 300
WASHINGTON, DC 20016-3341, US**

72 Inventor/es:

MAYE, JOHN, PAUL

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 443 991 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

Ácidos del lúpulo en sustitución de antibióticos en la alimentación animal

Antecedentes de la invención

5 La presente invención se refiere a un suplemento de alimentos orgánicos y un alimento para animales. En particular, la invención se refiere a la sustitución de antibióticos en la alimentación animal con ácidos del lúpulo.

10 El ganado, tales como vacas, pollos y cerdos, son alimentados con algunos de los alimentos más baratos que los agricultores puedan comprar. Los animales que pastan y comen alimentos de baja calidad están sujetos a una dieta contaminada con bacterias y protozoos. El rumen de los animales de granja es un sistema complejo compuesto de una variedad de bacterias y protozoos. La mayoría de las bacterias gram-negativas son beneficiosas para la alimentación y la absorción de energía, comúnmente conocidos como bacterias y protozoos "buenos", mientras que las bacterias y los protozoos gram-positivos reducen la absorción de los alimentos y de energía, comúnmente conocidos como bacterias y protozoos "malos". Los antibióticos en la alimentación animal pueden matar las bacterias y los protozoos que impactan negativamente el crecimiento de los animales. Sin embargo, altos niveles de antibióticos pueden esterilizar el rumen haciendo que el animal se enferme, y en algunos casos, provocar la muerte. Por lo tanto, se utilizan niveles muy bajos de antibióticos para controlar las bacterias nocivas en el rumen.

15 Los altos niveles de microorganismos en el tracto digestivo del animal pueden reducir la eficiencia de absorción del alimento y hacer que el animal se enferme e incluso que muera. El uso ineficiente de los alimentos también afecta negativamente al medio ambiente mediante el aumento de la producción de desechos por parte de los animales que contienen altos niveles de nitratos e incrementan la emisión de metano por los animales. Los caballos y los animales de zoológico también experimentan trastornos digestivos debido a la infección por bacterias y por protozoos.

20 Los ionóforos son una clase de antibióticos de uso común en la alimentación animal. Los ionóforos son antibióticos de poliéter encargados de transportar iones a través de membranas biológicas. Los ionóforos son moléculas que tienen varios átomos de oxígeno repartidos a lo largo de la molécula. Las posiciones de los átomos de oxígeno crean una cavidad que puede atrapar cationes. Los ionóforos tienen regiones polares y no polares que aumentan el atrapamiento de cationes y la interacción con las membranas celulares de bacterias. Los ionóforos son eficaces contra las bacterias gram-positivas y protozoos, pero no contra las bacterias gram-negativas. Matando o controlando el crecimiento de estos microorganismos, se puede mejorar la eficiencia de la alimentación animal y la salud y el bienestar de los animales.

25 Muchas personas desean poder adquirir y consumir productos avícolas y cárnicos orgánicos. Por ejemplo, Europa regula fuertemente la venta, el uso y la importación de productos avícolas y cárnicos no orgánicos. La carne y los productos avícolas que contienen antibióticos no se consideran productos orgánicos. El uso de ionóforos en la alimentación animal hace que la carne de esos animales pueda ser considerada no orgánica. Existe un fuerte deseo por descubrir alternativas a los antibióticos que pueden ser utilizadas en la alimentación animal.

30 Patent Abstracts of Japan vol. 013 , no. 447 (C - 642) y el documento JP 01-172341 divulgan un agente de prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas del ganado y aves domésticas causadas por Clostridium perfringens, que contienen lúpulo. Se especifica que los lúpulos contienen humulona y lupulona. Dicho medicamento puede ser mezclado en los alimentos para animales, tales como alimentos para cerdos. Se demostró una disminución de la mortalidad de los cerdos.

35 Patent Abstracts of Japan vol. 013 , no. 447 (C - 642) y el documento JP 01-172340 enseñan un agente para la prevención y tratamiento para la infección del pollo causada por Estafilococos áureos, que contiene lúpulo. Se especifica que el lúpulo contiene humulona y lupulona. Dicho medicamento puede ser mezclado en el alimento para el pollo. Se demostró una disminución de la mortalidad de los pollos.

40 Beuchat L. R. et al.: "Antimicrobials occurring naturally in foods", Food Technology, Instituto de Tecnologías de Alimentos. Chicago, EE.UU., vol . 43, no. 1, 1989, páginas 134 - 142, XP000025938, ISSN: 0015-6639 divulga antimicrobianos que se encuentran naturalmente en los alimentos. Pueden ser utilizados como conservantes sin que afecten adversamente los alimentos. Las humulonas y lupulonas muestran actividad antimicrobiana. Las bacterias gram-negativas y los hongos son menos sensibles a los efectos de las humulonas y las lupulonas que las bacterias gram-positivas. Se han observado efectos inhibidores en el intervalo de 1 - 100 µg / ml.

45 El documento WO 01 / 76614 A divulga un alimento para mejorar la producción del factor de crecimiento que comprende un extracto de Humulus lupulus. La mejora de la producción de factor de crecimiento nervioso (NGF) o del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) puede ser llevada a cabo en forma especialmente adecuada. Este documento divulga además la acción antibacteriana, la acción anti - tumoral, la acción sedante del Humulus lupulus.

Se indica que es preferible que el extracto de *Humulus lupulus* esté contenido en una cantidad de 0,001-15 % en peso o más en la alimentación. La alimentación puede ser suministrada a animales domésticos, ganado, caballos, cerdos.

- 5 La base de datos WPI Sección Ch, Semana 199.743 Thomson Scientific, Londres, GB, clase D 13, AN 1997-468881 XP002268355, & RU 2 075 298 C divulga un alimento para animales de granja que contiene lúpulos y granos de cerveza, así como cebada.

El documento GB 120 166 A divulga un producto alimenticio que contiene harina de cebada, pulpa vegetal y bagazo de lúpulo. El producto alimenticio comprende al menos un 15 % de bagazo de lúpulo o harina de lúpulo.

Breve resumen de la invención

- 10 Se muestra y describe un método de uso de ácidos del lúpulo como suplemento alimenticio orgánico.

Se describe un método de uso de ácidos del lúpulo como suplemento alimenticio orgánico para el ganado que incluye el suministro de los ácidos del lúpulo para ingesta oral por medio de la mezcla de los ácidos con el alimento para el ganado. Los ácidos se mezclan con el pienso en una cantidad para inhibir ciertos tipos de bacterias indeseables en el sistema digestivo del ganado. En un aspecto, la cantidad de ácido de lúpulo para inhibir ciertos tipos de bacterias indeseables en el sistema digestivo del animal es de aproximadamente 1 ppm hasta aproximadamente 30 ppm. La composición y el método descrito permiten la producción de ganado libre de antibióticos.

- 15 La invención se comprenderá mejor haciendo referencia a la siguiente descripción detallada de la forma de realización preferida. La discusión a continuación es descriptiva, ilustrativa y sirve como ejemplo y no debe ser tomada como una limitación del alcance definido por cualquiera de las reivindicaciones adjuntas.

20

Descripción detallada del mejor modo de realización de la invención

La planta de lúpulo, *Humulus lupulus*, produce ácidos orgánicos conocidos como ácidos alfa (humulona) y ácidos beta (lupulona). Estos ácidos del lúpulo incluyen, pero no se limitan a los ácidos alfa y ácidos beta sino también a sus formas isomerizadas, formas reducidas y sales. Los ácidos beta incluyen lupulona, colupulona, adlupulona, así como otros análogos. Los alfa ácidos incluyen humulona, cohumulona, adhumulona, posthumulona, y prehumulona, así como otros análogos. Se componen de una molécula hexagonal compleja con varias cadenas laterales, con grupos cetona y alcohol. Cada humulona diferente difiere en la composición de la cadena lateral. Se sabe que los ácidos alfa se isomerizan cuando se exponen al calor para formar ácidos iso-alfa. Se sabe que los ácidos iso-alfa y sus formas reducidas, a saber, ácidos rho-iso-alfa, tetrahidro ácidos iso-alfa y ácidos hexahidro iso-alfa son ácidos del lúpulo comúnmente utilizados para dar sabor a la cerveza.

- 25
- 30

Los antibióticos ionóforos son efectivos para matar e inhibir el crecimiento de muchas bacterias gram-positivas y protozoos, pero no las bacterias gram-negativas. Como antibióticos ionóforos, se sabe también que los ácidos del lúpulo son efectivos para matar e inhibir el crecimiento de bacterias gram-positivas y protozoos, pero no las bacterias gram-negativas. La patente de los Estados Unidos No. 6.379.720 revela que se sabe que los ácidos beta matan e inhiben el crecimiento de algas. La patente de los Estados Unidos No. 6.352.756 y la patente los Estados Unidos No. 6.423.317 divulgan que se sabe que algunos ácidos del lúpulo tales como los ácidos alfa, los ácidos beta, los ácidos iso-alfa y los ácidos tetrahidro iso-alfa matan los protozoos que se encuentran comúnmente en los ríos y lagos. Las algas y los protozoos están en el mismo reino, Protista, y ambos son organismos unicelulares. Tanto los ionóforos como los ácidos del lúpulo actúan mediante la interrupción de los niveles de pH dentro de una célula bacteriana causando eventualmente que deje de crecer o que muera. También se sabe que los ácidos del lúpulo tienen una región polar y una no polar y son muy buenos en cationes de captura.

- 35
- 40

El principal gas excretado por los animales de granja es el dióxido de carbono (CO₂), que es una fuente de carbono completamente oxidada. Se considera al metano (CH₄) una fuente de carbono no oxidada como una pérdida de energía proveniente de los animales de granja y es un contaminante ambiental. Se estima que aproximadamente el 2-12% de la energía de los animales de granja se pierde debido a la excreción de gas metano. Como resultado de esta pérdida de energía, se incrementa el costo para la alimentación de animales. Se cree que los animales de granja son responsables de aproximadamente el 15 - 20% del metano que se encuentra en la atmósfera. Este aumento de metano es responsable, en parte, por el calentamiento global, que afecta negativamente el medio ambiente.

- 45
- 50 La introducción de bajos niveles de ácido beta, ácidos alfa isomerizados en un rumen artificial muestra efectos positivos en la fermentación de cebada y de maíz (almidón) y en la fermentación de alfalfa (fibra). Niveles tan bajos como de 2 ppm de ácidos beta aumentan los niveles de propionato en la fermentación de la cebada en un 97% y un

56% en la fermentación de la alfalfa. Un aumento en la concentración de propionato es significativo ya que el propionato representa aproximadamente el 50% de la fuente de carbono utilizada por los animales para el crecimiento.

5 Además, una concentración de ácido beta de 2 ppm en el rumen artificial provocó una reducción en los niveles de butirato en un 84% en la cebada y del 35% en la alfalfa. El butirato es un compuesto intermedio para la producción de metano. Una reducción de butirato significa una reducción en el metano. La reducción de metano ofrece el beneficio adicional de ayudar al medio ambiente al reducir las emisiones de gases de efecto invernadero. El ensayo de purina bacteriana muestra una reducción del 60% en el contenido de bacterias en la fermentación de la cebada. En general, los ácidos beta mejoran de forma significativa la fuente de carbono lograda a través del propionato y aumentan la captación de energía por parte del animal mediante la reducción de la producción de butirato.

15 En otra forma de realización, los ácidos del lúpulo como se reivindica, se pueden añadir a los suplementos nutricionales para el ganado. Se utilizaron los siguientes procedimientos de ensayo en cada uno de los ejemplos *in vitro* expuestos aquí. Se fermentaron piensos de cebada y alfalfa en un intestino artificial usando líquido del rumen que contiene una mezcla de bacterias que se encuentran comúnmente en el ganado. El rumen se elabora a partir de una mezcla compleja de bacterias y protozoos. Las bacterias gram-negativas son generalmente consideradas beneficiosas ya que contribuyen a la descomposición de la celulosa en compuestos beneficiosos para el crecimiento y energía de los animales. Las bacterias gram-positivas y protozoos generalmente no son beneficiosos ya que sus subproductos digestivos no son beneficiosos para el animal. Los organismos gram positivos que necesitan ser controlados incluyen *Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens* y *Butyrivibrio fibrisolvens*. El control de estos microorganismos tiene el efecto beneficioso de la disminución de la fermentación permitiendo por lo tanto que más nutrientes energéticos vayan al animal. El control de la bacteria *Methanobacterium ruminantium* reduce la conversión de H₂ en gas metano. El control de las diferentes especies de estreptococos y lactobacilos también reduce el uso indeseable del H₂ y permite que sea más utilizado en la formación deseable de propionato. Propionato es en gran parte responsable del crecimiento de los animales. *Isotricha* y *Entodini* son dos protozoos que infectan comúnmente el rumen. Una vez más ellos quitan energía y nutrientes del animal de granja. Durante la fermentación, se permite que compitan las bacterias "buenas" y las "malas" por el almidón y la fibra dentro de estos dos piensos. Se ensayaron las fermentaciones con bajos niveles de ácidos alfa, ácido beta, ácidos iso-alfa, ácidos rho-iso-alfa, ácidos tetrahidro-iso-alfa y ácidos hexahidro-iso-alfa fueron probados, así como un control que no contenía ácidos del lúpulo. Después de que se completó la fermentación del rumen, se analizaron los productos finales para determinar los efectos de estos ácidos del lúpulo.

Ejemplo 1

35 La Tabla 1 muestra que una cantidad tan pequeña como 1,25 ppm de ácido beta reduce la producción de gas aproximadamente en un 40% en cebada y 30% en alfalfa. Unas tasas lentas de producción de gas generalmente significan que el rumen convierte más de los alimentos valiosos en energía y carbono para el crecimiento del animal. Altas tasas de producción de gas por lo general significan mayores niveles de metano en el gas, y por lo tanto bajo consumo de alimento y de energía. En la Tabla 1, a continuación, SE significa error estándar.

Tabla 1. Producción de gas *in vitro*

Ítem	Nivel de ácidos beta, ppm				SE
	0	1,25	2,5	3,75	
Cebada					
Tasa de producción % / h	9,1	9,1	8,9	8,6	0,1
Gas total, mL / 72 h	404,3	242,3	273,0	265,2	8,0
Alfalfa					
Tasa de producción % / h	9,1	8,9	8,8	8,8	0,0
Gas total, mL / 72 h	431,3	312,7	303,0	308,3	5,2

Ejemplo 2

La Tabla 2 muestra la cantidad de fibra en pienso de cebada y de alfalfa. Este método de ensayo se utiliza para medir la fibra en el pienso. La fibra es generalmente de celulosa, hemicelulosa y lignina.

Tabla 2. Desaparición del sustrato *in vitro*

Ítem	Nivel de ácidos beta, ppm				SE
	0	1,25	2,5	3,75	
Cebada					
Desaparición, % de materia seca	68,2	60,3	64,8	59,8	0,9
Almidón	87,8	75,0	82,4	77,6	0,7
Alfalfa					
Materia seca	51,9	47,2	44,6	42,8	0,6
FDN	32,0	28,4	40,0	25,6	0,9
FDN = Fibra Detergente Neutra					

5 Ejemplo 3

En el ejemplo 3, se demostró que el lactato era un producto final de la fermentación *in vitro* de la cebada y la alfalfa con ácidos beta. La Tabla 3 muestra un aumento en lactato en el rumen artificial. El lactato es un producto intermedio en la formación de propionato. Una preocupación con el aumento de los niveles de lactato es una caída en el pH. El lactato es un ácido relativamente fuerte y bajos valores de pH en el rumen, reducen la absorción de los alimentos y energía. En este ejemplo, el hecho de que el pH no cayó fue un beneficio inesperado. Los ácidos beta son capaces de controlar las bacterias nocivas, permitiendo así la formación de más de lactato, un producto intermedio para la producción de propionato.

10

Tabla 3. Productos finales de la fermentación *in vitro*

Ítem	Nivel de ácidos beta, ppm				SE
	0	1,25	2,5	3,75	
Cebada					
pH	5,1	4,9	4,9	4,9	0,0
Lactato µg / mL	82,9	317	319	257	19,1
Alfalfa					
pH	5,6	6,0	5,9	5,8	0,0
Lactato µg / mL	22,8	26,1	27,7	30,6	3,2

Ejemplo 4

15 En el Ejemplo 4, se permitió que se fermentara la cebada en un intestino artificial al que se añadieron 1,25 ppm, 2,5 ppm o 3,75 ppm de ácidos beta y se midieron los productos finales de ácidos grasos volátiles de la fermentación *in*

- 5 *vitro* de la cebada. Los ácidos beta son efectivos para matar e inhibir el crecimiento de bacterias gram positivas y protozoos, pero no las bacterias gram negativas. Ya que las bacterias gram negativas forman acetato, *B. ruminicola*, no se espera que los ácidos beta controlarían la formación de acetato. Sin embargo, se espera una leve reducción en los niveles de acetato si aumentan los niveles de propionato. La Tabla 4 muestra claramente que los ácidos beta ayudan en la formación de propionato. A medida que aumenta la cantidad de ácido beta en el intestino sintético, aumenta la cantidad de propionato. Un 97% de aumento en la concentración de propionato es un aumento muy significativo y positivo ya que el propionato conduce al crecimiento de los animales. Una reducción del 84% en el butirato también es muy bueno ya que el butirato es eventualmente degradado por las bacterias gram positivas, *Methanobacterium ruminantium*, en metano, que es energía perdida. Así pues, parece que los ácidos beta controlan las bacterias gram positivas *Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, que son responsables de la producción de butirato. Los resultados en la Tabla 4 muestran un aumento en propionato (fuente de carbono) y una disminución de butirato, que se traduce en pérdida de energía para el animal de granja.

Tabla 4. Productos finales de fermentación *in vitro* de cebada

Ítem	Nivel de ácidos beta, ppm				SE
	0	1,25	2,5	3,75	
AGV totales $\mu\text{mol} / \text{mL}$	213,8	146,0	195,5	188,8	3,8
Acetato	36,3	53,4	44,3	40,2	0,7
Propionato	25,9	36,3	50,7	51,2	0,5
Moles de butirato / 100 moles	35,0	8,3	5,6	5,7	0,6

Ejemplo 5

- 15 En el Ejemplo 5, se deja fermentar la alfalfa en un intestino artificial al que se añadieron 1,25 ppm, 2,5 ppm o 3,75 ppm de ácidos beta y se midieron los productos finales de ácidos grasos volátiles de la fermentación *in vitro* de la alfalfa. Como en el Ejemplo 4, no se espera que los ácidos beta controlarían la formación de acetato, que es formado por bacterias gram negativas. Sin embargo, a medida que los niveles de acetato disminuyen, la tabla 5 muestra que 1,25 - 2,5 ppm de ácidos beta es responsable por un aumento del 56% en la producción de propionato.
- 20 También se reducen los niveles de butirato en un 35%. En consecuencia, se reduce la emisión de etano, mejora la eficiencia energética, y se incrementa el crecimiento animal. En la Tabla 1, a continuación, SE significa error estándar.

Tabla 5. Productos finales de fermentación *in vitro* de alfalfa

Ítem	Nivel de ácidos beta, ppm				SE
	0	1,25	2,5	3,75	
AGV totales $\mu\text{mol} / \text{mL}$	232,5	206,9	198,2	204,7	6,7
Acetato	61,4	52,7	52,4	51,4	0,3
Propionato	24,3	36,7	38,6	38,8	0,4
Moles de butirato / 100 moles	10,1	7,9	6,5	6,4	0,2

Ejemplo 6

- 25 Como se muestra en la Tabla 6, los ácidos beta disminuyen significativamente los protozoos tales como *Isotricha* en un 86% y entodiniomorfos aproximadamente en un 25% en la fermentación de la cebada. La purina bacteriana, que es una medida de las bacterias totales, muestra una disminución significativa en la fermentación de la cebada en un 60%. No parece haber ningún efecto sobre los protozoos de la alfalfa y la purina bacteriana de la alfalfa por los

ácidos beta. Una vez más, la reducción de los niveles de bacterias y protozoos significa más alimentos y energía para el crecimiento animal.

Tabla 6. Medición de los microbios in vitro

Ítem	Nivel de ácidos beta, ppm				
	0	1,25	2,5	3,75	SE
Cebada					
Protozoos x 10 ³					
Isotrichia, no. / mL	14,0	9,7	2,0	1,7	3,4
Entodiniomorfo spp no. / mL	10,0	11,7	7,7	4,7	2,7
Purina bacteriana, mg / tubo	63,3	28,5	25,9	23,7	5,7
Alfalfa					
Protozoos x 10 ³					
Isotrichia, no. / mL	1,0	1,0	4,0	2,7	0,7
Entodiniomorfo spp no. / mL	1,7	1,7	3,3	1,7	0,9
Purina bacteriana, mg / tubo	49,8	44,1	33,1	38,1	5,7

Ejemplo 7

5 Como se muestra en la Tabla 7, se muestra el efecto de los ácidos del lúpulo sobre la producción de gas, la producción del producto final, y el crecimiento microbiano en la fermentación *in vitro* en alfalfa. Las pruebas incluyeron un grupo de control C no tratado con ácidos alfa o ácidos beta, el grupo A recibió 2 ppm de ácidos alfa, el grupo B recibió 2 ppm de ácidos beta, el grupo H recibió 2 ppm de ácidos hexahidro iso-alfa, el grupo I recibió 2 ppm de ácidos iso-alfa, el grupo R recibió 2 ppm de ácidos rho-iso-alfa, el grupo T recibió 2 ppm de ácidos tetrahidro iso-
 10 alfa, y el grupo M recibió 6 ppm del antibiótico monensina disponible a través de Eli Lilly de Indianápolis, Indiana. El rumen es el sitio primario para la acción de la monensina en la vaca. La monensina se encuentra disponible en varias formas para su uso en el ganado y ha estado disponible para su uso en el ganado vacuno y novillas durante unos 20 años. Se puede incorporar en el pienso como un polvo o se puede administrar como un bolo ruminal por medio del uso de un dispositivo de geometría variable, también llamado cápsula de liberación controlada. La cápsula
 15 consiste en un cilindro de plástico con alas plegables en un extremo, lo que permite que la cápsula sea retenida en el rumen. Estas cápsulas, que contienen 32 gramos de monensina liberada durante más de 100 días, han demostrado ser un medio útil para la realización de grandes ensayos controlados aleatorios. Una tasa de inclusión típica para la monensina en el pienso es de 10 a 30 mg por kg de pienso terminado.

20 La monensina actúa para disminuir en forma selectiva las poblaciones de ciertas bacterias del rumen. Esto lo logra modificando el movimiento de iones a través de las membranas celulares. Las bacterias gram positivas del rumen producen hidrógeno, amoníaco, lactato, acetato, y metano y son más sensibles a la monensina, mientras que las bacterias gram negativas que producen propionato y succinato son menos susceptibles. Las diferencias en la estructura de la membrana celular entre las bacterias gram positivas y gram negativas son principalmente las responsables de las diferentes sensibilidades de las bacterias a la monensina. Algunas especies de bacterias gram
 25 positivas, sin embargo, pueden adaptarse con el tiempo a la presencia de monensina y algunas especies gram negativas son sensibles a altas concentraciones de monensina. Las bacterias gram positivas producen menos metano cuando se añade monensina a la dieta.

30 Como se muestra en la Tabla 7, casi todos los seis de los ácidos del lúpulo ensayados mostraron efectos positivos sobre la fermentación del rumen. Aunque los ácidos alfa y los ácidos rho-iso-alfa no redujeron la tasa de producción total de gas, los ácidos beta (grupo B), los ácidos hexahidro iso-alfa (grupo H), los ácidos iso-alfa (grupo I) y los ácidos tetrahidro iso-alfa (grupo T) experimentaron una reducción en la tasa de producción de gas, en la producción

total de gas, y en la fermentación. La monensina no redujo la producción de gas, la producción total de gas, y la fermentación.

5 En lo que respecta a los productos finales producidos, el pH era más básico con la introducción de ácidos iso-alfa en el grupo I y se mantuvo constante con la introducción de ácidos alfa mixtos. No se demostró caída en el pH en ninguno de los grupos.

10 Aumentó la producción de lactato, un compuesto intermedio para el propionato, cuando se trató la fermentación de alfalfa con ácidos beta (grupo B), ácidos hexahidro iso-alfa (grupo H), ácidos iso-alfa (grupo I) y tetrahidro iso-alfa ácidos (grupo T). La producción de ácidos grasos volátiles (AGV) disminuyó en todos los grupos y más marcadamente en el grupo I. No obstante, la producción de ácidos grasos específicos para el acetato aumentó para los ácidos alfa y ácidos rho-iso-alfa, aumentó el propionato en todos los grupos excepto para los ácidos alfa. Aumentó el butirato sólo con ácido rho-iso-alfa, y la producción de valerato no aumentó en ninguno de los grupos. Los niveles de propionato aumentaron significativamente con ácidos beta, ácidos iso-alfa, ácidos tetrahidro iso-alfa y monensina. Esto puede ser una función del aumento de lactato, un compuesto intermedio en la producción de propionato. Con respecto a las mediciones microbianas, se encontró que la monensina elimina más efectivamente protozoos y purinas bacterianas del rumen artificial. Con la exclusión de la monensina, sólo el grupo A mostró alguna reducción en purinas bacterianas.

Tabla 7. Efectos de los ácidos del lúpulo sobre la fermentación in vitro de la alfalfa

Grupo	Tratamiento								
	C	A	B	H	I	R	T	M	SE
Desaparición									
DM, %	63 ^a	62 ^{ab}	53 ^c	46 ^d	36 ^f	53 ^c	41 ^e	60 ^b	1,0
FDN, %	59 ^a	40 ^b	27 ^{bc}	17 ^{cd}	2 ^d	31 ^{bc}	9 ^d	32 ^{bc}	5,6
Producción de gas									
Tasa, % / h	9,2 ^a	9,2 ^a	9,0 ^c	9,0 ^c	9,1 ^b	9,0 ^c	9,1 ^b	9,2 ^a	0,0
Total, mL /72 h	304 ^a	328 ^a	262 ^b	242 ^b	150 ^d	307 ^a	202 ^c	320 ^a	12,6
mL/g fermentado	238 ^b	265 ^a	246 ^b	261 ^{ab}	207 ^b	287 ^a	247 ^b	263 ^{ab}	14,6
Productos finales									
pH	5,7 ^g	5,7 ^g	6,0 ^e	6,2 ^c	6,6 ^a	6,1 ^d	6,4 ^b	5,8 ^f	0,0
Lactato, g / mL	52 ^d	48 ^d	63 ^d	83 ^b	168 ^a	46 ^d	68 ^c	38 ^d	5,3
AGV, mol / mL	269 ^a	257 ^a	184 ^c	173 ^c	132 ^d	184 ^c	146 ^d	215 ^b	4,9
Acetato, % en moles	63 ^b	65 ^a	54 ^e	61 ^c	57 ^d	64 ^{ab}	56 ^d	60 ^c	0,4
Propionato, % en moles	20 ^f	20 ^f	38 ^a	27 ^d	37 ^b	22 ^e	39 ^a	31 ^c	0,2
Butirato, % en moles	10 ^b	10 ^b	6 ^c	10 ^b	5 ^d	13 ^a	4 ^e	6 ^c	0,2
Valerato, % en moles	2 ^a	2 ^a	1 ^b	1 ^b	0 ^c	1 ^b	0 ^c	2 ^a	0,1
Mediciones de microorganismos									
Protozoos x 10 ³									

(continuación)

Isotrichia, no./ mL	2 ^a	2 ^a	0,3 ^b	0,3 ^b	0 ^c	0,3 ^b	0,7 ^b	0 ^c	0,5
Entodinia, no./mL	20 ^a	22 ^a	14 ^{8b}	13 ^{ab}	22 ^a	9 ^b	21 ^a	6 ^c	2,7
Purinas bacterianas, mg/tubo	3,2 ^{bc}	3,1 ^{bc}	3,4 ^{abc}	5,0 ^a	4,7 ^{ab}	3,2 ^{bc}	4,0 ^{abc}	2,6 ^c	0,4

(C) control, (A) ácidos alfa (2 ppm), (B) ácidos beta (2 ppm), (H) ácidos hexahidro iso-alfa (2), (I) ácidos iso-alfa (2 ppm), (R) ácidos rho-iso-alfa (2), (T) ácidos tetrahidro iso-alfa (2 ppm) y (M) el antibiótico monensina (6 ppm)

^{a,b,c} Promedios con diferentes superíndices son diferentes (P < 0,01)

Ejemplo 8

5 Como se muestra en la Tabla 8, se demostró el efecto de los ácidos del lúpulo en la producción de gas, en la producción del producto final, y en el crecimiento microbiano en la fermentación *in vitro* en la cebada. Las pruebas incluyeron un grupo de control C tratado sin ácidos alfa o ácidos beta, el grupo A recibió 2 ppm de ácidos alfa, el grupo B recibió 2 ppm de ácidos beta, el grupo H recibió 2 ppm de ácidos hexahidro iso-alfa, el grupo I recibió 2 ppm de ácidos iso-alfa, el grupo R recibió 2 ppm de ácidos rho-iso-alfa, el grupo T recibió 2 ppm de ácidos tetrahidro iso-alfa, y el grupo M recibió 6 ppm de antibiótico monensina.

10 La Tabla 8 muestra los efectos de los ácidos amargos del lúpulo en la producción de gas, en la producción del producto final, y el crecimiento microbiano en la fermentación *in vitro* de la cebada. Como se muestra en la Tabla 8, la introducción de ácidos alfa no redujo la tasa de producción total de gas. Los ácidos iso-alfa y los ácidos tetrahidro iso-alfa experimentaron una reducción en la tasa de producción de gas y todos los grupos experimentaron una reducción en la cantidad total de gas producido en un período de 72 horas.

15 Con respecto a los productos finales producidos, como con la alfalfa, el pH era más básico con la introducción de ácidos iso-alfa. El pH se mantuvo constante con la introducción de ácidos tetrahidro-iso-alfa. Todos los otros grupos se volvieron más ácidos.

20 La producción de lactato se incrementó en todos los grupos excepto el de la monensina. El incremento más notable fue en el grupo I, que era también el grupo más básico. La producción de ácidos grasos volátiles (AGV) disminuyó en los grupos B y T y, como en la alfalfa, más marcadamente en el grupo I. El propionato aumentó sólo en los grupos B, I y T. El butirato disminuyó en todos los grupos con respecto al control. Parece que el ácido particular más afectado por la introducción de ácidos alfa y ácidos beta en el rumen artificial que contiene cebada es el butirato.

25 Con respecto a las mediciones microbianas, no se observó ningún efecto en la disminución de las purinas bacterianas con la introducción de cualquiera de los ácidos alfa o los ácidos beta.

Tabla 8. Efectos de los ácidos del lúpulo en la fermentación *in vitro* de la cebada

Grupo	Tratamiento								SE
	C	A	B	H	I	R	T	M	
Desaparición									
DM, %	85 ^a	78 ^c	74 ^d	72 ^e	69 ^f	70 ^{ef}	72 ^{de}	83 ^b	0,7
Almidón, %	98 ^{ab}	100 ^b	97 ^{bc}	98 ^{ab}	89 ^b	92 ^d	94 ^{cd}	99 ^a	0,0
Producción de gas									
Tasa, % / h	9,0 ^{bc}	9,1 ^a	9,2 ^a	9,0 ^{bc}	8,9 ^d	9,1 ^{bc}	8,9 ^d	9,1 ^b	0,0

ES 2 443 991 T3

(continuación)

Total, mL /72 h	345 ^a	278 ^d	246 ^e	295 ^{cd}	316 ^b	297 ^{bcd}	303 ^{bc}	336 ^a	6,5
mL/g fermentado	208 ^c	187 ^d	171 ^e	213 ^{bc}	238 ^a	222 ^b	218 ^{bc}	212 ^{bc}	4,0
Productos finales									
pH	5,1 ^b	4,8 ^e	4,7 ^f	4,9 ^d	5,2 ^a	4,9 ^d	5,1 ^b	5,0 ^c	0,0
Lactato, g / mL	50 ^b	58 ^{cd}	78 ^{abc}	62 ^{cd}	95 ^{ab}	106 ^a	78 ^{abc}	36 ^d	9,1
AGV, mol / mL	257 ^b	277 ^a	227 ^c	261 ^b	201 ^d	257 ^b	211 ^d	263 ^b	3,8
Acetato, % en moles	32 ^d	43 ^b	37 ^c	39 ^c	25 ^e	46 ^a	24 ^e	32 ^d	0,9
Propionato, % en moles	24 ^c	20 ^d	37 ^a	20 ^d	29 ^b	16 ^e	30 ^b	24 ^c	0,9
Butirato, % en moles	33 ^a	24 ^c	14 ^e	28 ^b	23 ^d	29 ^b	22 ^d	28 ^b	0,5
Valerato, % en moles	8 ^d	12 ^c	11 ^c	12 ^c	23 ^a	8 ^d	24 ^a	14 ^b	0,5
Mediciones de microorganismos									
Protozoos x 10 ³									
Isotrichia, no./ mL	0,7	0,3	0	0,3	0,3	0,3	0	0	0,3
Entodinia, no./mL	82 ^a	41 ^b	43 ^b	33 ^b	50 ^b	35 ^b	37 ^b	38 ^b	6,0
Purinas bacterianas, mg/tubo	1,3 ^c	1,8 ^b	2,0 ^{ab}	2,1 ^{ab}	1,7 ^b	2,0 ^{ab}	1,3 ^b	1,5 ^b	0,1

(C) control, (A) ácidos alfa (2 ppm), (B) ácidos beta (2 ppm), (H) ácidos hexahidro iso-alfa (2), (I) ácidos iso-alfa (2 ppm), (R) ácidos rho-iso-alfa (2), (T) ácidos tetrahidro iso-alfa (2 ppm) y (M) el antibiótico monensina (6 ppm)

^{a,b,c} Promedios con diferentes superíndices son diferentes (P < 0,01)

Ejemplo 9

- 5 Como se muestra en la Tabla 9, se muestra el efecto de los ácidos del lúpulo en la producción de gas, la producción del producto final, y el crecimiento microbiano en la fermentación in vitro en la cebada. Las pruebas incluyeron un grupo de control C tratado sin ácidos alfa o ácidos beta, el grupo A recibió 2 ppm de ácidos alfa, el grupo B recibió 2 ppm de ácidos beta, el grupo H recibió 2 ppm de ácidos hexahidro iso-alfa, el grupo I recibió 2 ppm de ácidos iso-alfa, el grupo R recibió 2 ppm de ácidos rho-iso-alfa, el grupo T recibió 2 ppm de ácidos tetrahidro iso-alfa, y el grupo M recibió 6 ppm del antibiótico monensina.

Como se muestra en la Tabla 9, la tasa y la producción total de gas disminuyeron en todos los grupos excepto en el control y en el de la monensina.

Con respecto a los productos finales producidos, como con la alfalfa y la cebada, el pH era más básico con la introducción de ácidos iso-alfa. Todos los otros grupos se volvieron más ácidos.

- 15 La producción de lactato se incrementó en todos los grupos. El incremento más notable fue en el grupo R. El mayor número de grupos, en comparación con la cebada y la alfalfa, perecieron exhibir una reducción en la producción de ácidos grasos volátiles (AGV). La producción de AGV disminuyó en los grupos B, H, I y T. El propionato aumentó sólo en los grupos B, I y T. Sólo el valerato aumentó en todos los compuestos ensayados.

En cuanto a las mediciones microbianas, sólo en el maíz en comparación con la cebada y la alfalfa hubo alguna

disminución en purinas bacterianas mostrada por todos los grupos excepto el de la monensina. Además, se demostró que la entodinia disminuyó en todos los grupos excepto el de la monensina.

Tabla 9. Efectos de los ácidos del lúpulo en la fermentación *in vitro* del maíz

Grupo	Tratamiento								
	C	A	B	H	I	R	T	M	SE
Desaparición									
DM, %	90 ^a	85 ^b	80 ^c	76 ^d	62 ^f	73 ^e	73 ^e	91 ^a	0,7
FDN, %	91 ^{ab}	89 ^{ab}	80 ^{bc}	79 ^{bc}	54 ^e	65 ^{de}	68 ^{cd}	95 ^a	0,4
Producción de gas									
Tasa, % / h	9,1 ^a	9,0 ^a	9,0 ^a	9,0 ^a	8,9 ^b	9,0 ^a	8,9 ^b	8,9 ^b	0,0
Total, mL /72 h	368 ^b	309 ^c	283 ^{de}	288 ^d	275 ^e	293 ^d	313 ^c	398 ^a	3,8
mL/g fermentado	212 ^c	187 ^d	187 ^d	196 ^d	235 ^a	210 ^c	224 ^b	233 ^{ab}	3,3
Productos finales									
pH	5,1 ^b	4,7 ^g	4,8 ^f	4,9 ^e	5,2 ^a	4,9 ^d	5,0 ^c	5,0 ^c	0,0
Lactato, g / mL	22 ^c	87 ^b	73 ^b	64 ^b	86 ^b	152 ^a	66 ^b	58 ^{bc}	13,2
AGV, mol / mL	241 ^{bc}	284 ^a	231 ^{cd}	240 ^{bc}	188 ^e	245 ^{bc}	221 ^d	258 ^b	6,0
Acetato, % en moles	35 ^c	41 ^a	32 ^d	35 ^{cd}	29 ^e	38 ^b	25 ^f	26 ^f	0,8
Propionato, % en moles	28 ^c	17 ^f	39 ^a	20 ^{de}	37 ^b	22 ^d	36 ^b	20 ^e	0,7
Butirato, % en moles	27 ^c	30 ^b	16 ^e	30 ^b	18 ^d	29 ^b	18 ^d	35 ^a	0,5
Valerato, % en moles	6 ^f	12 ^d	12 ^d	15 ^c	16 ^{bc}	10 ^e	20 ^a	17 ^b	0,5
Mediciones de microorganismos									
Protozoos x 10 ³									
Isotrichia, no./ mL	0,3	0	0	0,7	0,7	0	0	0,7	0,4
Entodinia, no./mL	17 ^d	27 ^{bcd}	22 ^{cd}	40 ^a	37 ^{ab}	37 ^{ab}	37 ^{ab}	28 ^{bc}	3,5
Purinas bacterianas, mg/tubo	1,2 ^{ab}	1,1 ^{abc}	0,9 ^{abc}	0,8 ^b	1,0 ^{abc}	0,6 ^c	0,9 ^{abc}	1,4 ^a	0,1

(C) control, (A) ácidos alfa (2 ppm), (B) ácidos beta (2 ppm), (H) ácidos hexahidro iso-alfa (2), (I) ácidos iso-alfa (2 ppm), (R) ácidos rho-iso-alfa (2), (T) ácidos tetrahidro iso-alfa (2 ppm) y (M) el antibiótico monensina (6 ppm)

^{a,b,c} Promedios con diferentes superíndices son diferentes (P < 0,01)

- 5 Los ácidos del lúpulo se pueden utilizar para aumentar la absorción de alimentos y energía del pienso por parte de las aves de corral, tales como pollos y pavos, mediante el suministro de los ácidos del lúpulo para ingestión oral a los animales mediante la mezcla de los ácidos del lúpulo con el alimento. Los ácidos se mezclan con el pienso en una cantidad tal para inhibir ciertos tipos de bacterias indeseables en el sistema digestivo. La mezcla de los ácidos

5 del lúpulo con el alimento de las aves de corral también puede impedir que las aves de corral sean susceptibles a diversas enfermedades causadas por bacterias y por protozoos. Una cantidad efectiva de ácidos del lúpulo en el intervalo de aproximadamente 1 ppm hasta aproximadamente 30 ppm en el alimento de las aves de corral puede aumentar la absorción de energía e inhibir ciertos tipos de bacterias y protozoos. Además, un intervalo de aproximadamente 1 ppm hasta aproximadamente 20 ppm, o de aproximadamente 1 ppm hasta aproximadamente 10 ppm, o de aproximadamente 1 ppm hasta aproximadamente 5 ppm, o de aproximadamente 2 ppm de ácidos del lúpulo en el alimento de las aves de corral puede aumentar la absorción de energía e inhibir ciertos tipos de bacterias y protozoos.

10 Como ejemplo de las aves de corral, el pollo tiene un sistema digestivo simple, con pocos o ningún microorganismo viviendo en el sistema digestivo para ayudar a digerir el alimento como en rumiantes tales como el ganado. Los pollos dependen de enzimas para ayudar en la descomposición de los alimentos de modo que puedan ser absorbidos, al igual que los seres humanos.

15 El buche de ave es una bolsa formada por el esófago para servir como área de almacenamiento para los alimentos hasta que puedan ser pasados para la digestión en la molleja y los intestinos. El proventrículo es el verdadero estómago del ave de la que se segrega ácido clorhídrico y pepsina para ayudar en la digestión. Los músculos de la molleja son extremadamente fuertes y se utilizan para moler o triturar las partículas de alimentos. Este proceso es ayudado por la presencia de arena y grava recogidas por el ave. La digestión y absorción del alimento tiene lugar principalmente en el intestino delgado. El intestino delgado es similar al de los mamíferos, hay dos bolsas o sacos ciegos, de cerca de 4 - 6 pulgadas de longitud en la unión del intestino delgado y el grueso. El intestino grueso es corto, que consiste principalmente del recto de unos 3 - 4 pulgadas de longitud. El recto se vacía en la cloaca y las heces se excretan a través del orificio de salida. Por lo general toma alrededor de 2,5 horas para que la comida pase por el tracto digestivo desde el pico hasta la cloaca.

25 Al igual que el ganado, las gallinas sufren de una dieta contaminada con bacterias y protozoos. Por ejemplo, la coccidiosis es una enfermedad común que se encuentra en los pollos. Se produce cuando un pollo consume los protozoos coccidios. Los coccidios causan lesiones en el tracto digestivo de los pollos que luego se infectan por las bacterias gram positivas *Clostridium perfringens*. Este doble golpe hace que muchos pollos se enfermen gravemente e incluso mueran. Se utilizan bajos niveles de antibióticos en el alimento del pollo para matar los protozoos coccidios y las bacterias gram positivas *Clostridium*. Dado que los ácidos del lúpulo también son eficaces en el control del crecimiento de protozoos y bacterias gram positivas, es probable que los pollos pueden beneficiarse de una dieta que contiene ácidos del lúpulo.

Ejemplo 10

Se analizaron siete muestras de ácidos del lúpulo para poner a prueba la concentración inhibidora mínima (CIM) contra una cepa de *Clostridium perfringens*. La cepa de *C. perfringens* (CP - 6) se obtuvo a través de Colorado Quality Research, Inc.

35 El cultivo bacteriano y todos los ácidos del lúpulo se refrigeraron hasta su utilización. Se ensayaron los siete ácidos del lúpulo (identificados a continuación por la marca registrada). Todos estaban en una concentración de aproximadamente 1%:

Isohop™; 1,0%

Betastab™ 10A; 0,96%

40 Alphahop™; 0,93%

Tetrahop™; 1,0%

Hexahop™; 0,97%

HHBA™; 1,0%

Redihop™; 1,0%

45 Se propagó en forma anaerobia *C. perfringens* CP-6 en BHI (pH 7,2). El crecimiento duró 24 horas a 35 - 37 °C. Después de 24 h, la población del cultivo madre era de aproximadamente 10⁸ ufc / ml.

Se añadieron los ácidos del lúpulo en tubos de 10 ml de BHI hasta una concentración final de 80 µg / ml. Se añadió cloranfenicol a un tubo de 10 ml hasta una concentración final de 80 µg / ml como control positivo. Los tubos se

ES 2 443 991 T3

inocularon con 100 µl del cultivo madre y se incubaron en forma anaeróbica a 35 - 37 °C durante 24 h.

5 Para el estudio de la CMI, se añadieron diluciones dobles de cada ácido del lúpulo en tubos de 10 ml de BHI, a partir de una concentración alta de 80 µg / ml y una concentración baja de 2,5 µg / ml. Se utilizó Cloranfenicol a razón de 80 µg / ml como control positivo. Se inoculó el cultivo hasta una concentración final de $3,0 \times 10^6$ ufc / ml y se incubaron los tubos como anteriormente. A las 24 h, se leyeron las densidades ópticas a 405 nm, y se determinaron las poblaciones de células.

Para los ácidos del lúpulo que muestran la inhibición completa a 2,5 µg / ml, se llevaron a cabo esquemas de dilución, adicionalmente hasta 1,25; 0,625; 0,312; y 0,156 µg / ml.

10 Todos los ácidos del lúpulo mostraron una inhibición completa de *C. perfringens* CP-6 a razón de 80 µg / ml. La siguiente tabla muestra la CMI para todos los ácidos del lúpulo analizados.

Ácido	CMI
Isohop™	63,0 µg / ml
Betastab™	5,7 µg / ml
Alphahop™	56,0 µg / ml
Tetrahop™	14,0 µg / ml
Hexahop™	7,5 µg / ml
HHBA™	0,39 µg / ml
Redihop™	53,0 µg / ml

Para la propagación de *C. perfringens* CP-6, se encontró que BHI (pH 7,2) era adecuado. La población del cultivo alcanzó 10^8 ufc / ml en 24 horas cuando se incuban en condiciones anaerobias a 35 - 37 °C. Para asegurar que el ensayo estaba funcionando correctamente, se desafió el cultivo con 80 µg / ml de cada ácido del lúpulo en BHI. A esta concentración, todos los ácidos del lúpulo mostraron una inhibición completa del cultivo.

15 Los ensayos de CMI mostraron que HHBA™ (CMI de 0,39 µg / ml) fue superior a todos los otros ácidos del lúpulo en la inhibición de *C. perfringens* CP-6 a pH 7,2. Mostró casi una CMI casi 15 veces mayor que el siguiente ácido de lúpulo más efectivo, Betastab™. Betastab™ (CMI de 5,7 µg / ml) y Hexahop™ (CMI de 7,5 µg / ml) fueron los siguientes dos ácidos del lúpulo más efectivos. Tetrahop™ mostró un nivel medio de inhibición (CMI de 14,0 µg / ml), mientras que Isohop™ (CMI de 63,0 µg / ml), Alphahop™ (CMI de 56,0 µg / ml), y Redihop™ (CMI de 53,0 µg / ml) fueron los menos inhibidores.

20 Es evidente a partir de este estudio en particular que el ácido del lúpulo más eficaz en la inhibición de *C. perfringens* CP-6 a pH 7,2 es HHBA™. Betastab™ y Hexahop™ también eran fuertemente inhibidores bajo las condiciones del estudio.

25 Con base en los resultados del Ejemplo 10 anterior, se cree que se pueden añadir los ácidos del lúpulo al alimento para aves de corral para proteger a las aves de corral de una variedad de enfermedades bacterianas que pueden ser adquiridas a través de alimentos infectados. Pollos, pavos y otras aves son susceptibles a las siguientes enfermedades bacterianas:

30 1. Infecciones por coliformes. Los problemas atribuidos a infecciones por coliformes son a menudo causados por cepas del organismo *Escherichia coli*. Las rutas principales de invasión por parte del organismo son el sistema respiratorio y el tracto gastrointestinal. Los problemas pueden ser el resultado de una infección de coliformes ya sea solos como en una infección primaria o en combinación con otros agentes causantes de enfermedad como una complicación o infección secundaria. Las infecciones secundarias comúnmente se producen como parte del síndrome clásico de enfermedad de los sacos de aire como una complicación con infecciones provocadas por *Mycoplasma gallisepticum*.

35 Existen muchas cepas diferentes o tipos serológicos dentro del grupo de las bacterias *E. coli*. Muchos de ellas son habitantes normales en el tracto intestinal de los pollos y los pavos, y en consecuencia son organismos comunes en el ambiente de las aves. Existe una marcada variación entre las diferentes cepas en su capacidad para causar

enfermedad. Algunas son graves y por sí mismas pueden causar enfermedad, mientras que otras son supuestamente inofensivas. Existen todos los grados de patogenicidad entre los dos extremos.

5 2. Cólera Aviar. El organismo causante de cólera aviar es *Pasteurella multocida*. Las principales fuentes de infección incluyen agua contaminada y piensos. En el pasado, las vacunas bacterianas administradas adecuadamente eran útiles para prevenir el cólera aviar, particularmente en pavos. Su uso debe ser combinado con un rígido programa de saneamiento. Aunque los fármacos por lo general alteran el curso de un brote de cólera aviar, las aves afectadas siguen siendo portadoras y la enfermedad tiene tendencia a repetirse cuando se interrumpe el tratamiento. Esto puede requerir un tratamiento prolongado con fármacos añadidos al alimento y al agua. Las sulfamidas y los antibióticos de amplio espectro (penicilina) suelen controlar las pérdidas.

10 3. Enteritis necrótica. La enteritis necrótica es una enfermedad aguda que produce una marcada destrucción de la mucosa intestinal del tracto digestivo. Nombres comunes en este campo, tales como podredumbre intestinal, intestino tipo coliflor y sucio describen con exactitud la condición. La enfermedad es causada por *Clostridium perfringens*, una bacteria en forma de barra formadora de esporas. Organismos bacterianos y sus toxinas son la causa primaria pero la coccidiosis puede ser un factor contribuyente. La mayor parte del daño a la mucosa intestinal es aparentemente debido a las toxinas producidas por los organismos bacterianos.

En el pasado, la bacitracina o virginiamicina eran tratamientos eficaces administrados en el alimento. La bacitracina se puede administrar también en el agua potable. El tratamiento de la vitamina de apoyo puede mejorar la eficacia de los tratamientos.

20 4. Enteritis ulcerativa. La enteritis ulcerativa es una infección aguda o crónica de las aves de caza, pollos, pavos y otras aves de corral. La causa de la enfermedad es *Clostridium colinum*, una bacteria tipo barra que forma esporas. La infección se propaga por las heces de las aves enfermas o portadoras a las aves sanas.

25 En el pasado, la bacitracina y la penicilina eran los fármacos más efectivos en el tratamiento y prevención de esta enfermedad. Si se utilizaba bacitracina, se recomendaba la incorporación en el alimento en niveles de hasta 200 gramos por tonelada de pienso. La adición de bacitracina al agua, a razón de una cucharadita por galón era recomendada para el control de un brote de la enfermedad. La penicilina también se utiliza para tratar la enfermedad si la bacitracina no es efectiva.

30 5. Pulorosis. La pulorosis es una enfermedad bacteriana infecciosa aguda o crónica, que afecta principalmente a los pollos y a los pavos, pero la mayoría las aves domésticas y salvajes pueden infectarse. La causa es una bacteria llamada *Salmonella pullorum*. Los organismos patógenos pueden entrar al ave a través de las vías respiratorias (como en la incubadora) o del sistema digestivo.

6. Tifosis aviar. La tifosis aviar es una enfermedad infecciosa bacteriana, contagiosa, que generalmente es aguda, pero algunas veces crónica. Afecta principalmente a aves domésticas y salvajes incluyendo pollos, pavos, patos, palomas, faisanes y otras aves de caza. La causa es la bacteria, *Salmonella gallinarum*. Los organismos patógenos pueden entrar al ave a través del sistema respiratorio o digestivo.

35 La prevención y el control dependen en gran medida de las prácticas básicas de prevención de enfermedades, incluyendo los grupos pollitos que hacen eclosión libres de la enfermedad, una práctica de saneamiento estricta en la granja, provisión de alimento y agua limpios, y la disposición adecuada de todas las aves muertas. El agente causal puede vivir fuera del cuerpo de las aves durante al menos seis meses, por lo que se requiere de precauciones de adicionales de manejo para romper el ciclo de la enfermedad. No se puede depender de fármacos, como medio de prevención contra la tifosis y no se recomiendan para este fin. Las aves infectadas pueden ser recuperadas utilizando los mismos medicamentos usados para salvar a las aves infectadas por pullorum.

40 7. Botulismo. El botulismo es una enfermedad causada por la ingestión de una toxina producida por la bacteria *Clostridium botulinum*. Todas las aves de corral y la mayoría de las aves silvestres son susceptibles a los efectos de la toxina. Muchas muertes de seres humanos también han sido atribuidas al consumo de alimentos o agua que contienen la toxina.

50 El botulismo no es una infección bacteriana, sino una condición producida por un subproducto del crecimiento de las bacterias. El organismo es común en la naturaleza y se encuentra ampliamente difundido en los suelos. La ingestión del organismo no es perjudicial. Se convierte en peligrosa sólo cuando las condiciones son favorables para su crecimiento y formación posterior de toxinas. El organismo crece mejor en condiciones de alta humedad y temperatura relativamente alta y en un entorno que contiene material orgánico en descomposición (de planta o animal). El organismo requiere de un entorno en el que se ha eliminado todo el oxígeno atmosférico. El organismo no puede multiplicarse en presencia de aire. El botulismo se presenta después de que se consume el material animal o vegetal en descomposición que contiene la toxina.

La toxina es una de las más potentes descubiertas por los científicos. La toxina es relativamente estable al calor, pero puede ser destruida por ebullición. Existen diferentes tipos de la toxina; los tipos A y C provocan la enfermedad en las aves, mientras que el tipo B produce con frecuencia la enfermedad en el hombre.

5 Se pueden añadir ácidos del lúpulo en el alimento de las aves de corral para protegerlas de una variedad de enfermedades causadas por protozoos que puede ser adquiridas a través de alimentos infectados. Pollos, pavos y otras aves son susceptibles a las siguientes enfermedades por protozoos.

10 1. Coccidiosis. Como se discutió anteriormente, la coccidiosis es una enfermedad de las aves de corral causada por un animal o protozoo microscópico provocada por animales microscópicos llamados coccidios. Existen muchas especies de coccidios que pueden infectar a las aves, los animales domésticos y los seres humanos. Cada especie de coccidia es específica del huésped y no infecta a una gran variedad de animales. Los pollos son susceptibles a cualquiera de las nueve especies de coccidios, los pavos son susceptibles a siete especies y las codornices son susceptibles a al menos cuatro especies diferentes de coccidios.

15 La coccidiosis se transmite por contacto directo o indirecto con los excrementos de aves infectadas. Cuando un ave ingiere coccidia, los organismos invaden el revestimiento del intestino y producen daños en los tejidos que se someten a reproducción. El número de coccidios infecciosos consumidos por el huésped es un factor primordial en cuanto a la gravedad de la infección resultante. Una infección puede ser lo suficientemente leve como para pasar desapercibida, mientras que una dosis infecciosa grande de coccidias puede producir lesiones graves que pueden causar la muerte. Los coccidios se transmiten fácilmente de un lugar a otro en las botas y la ropa contaminados, las aves que vuelan libremente, equipos, sacos de alimentos, insectos y roedores.

20 En el pasado, se prevenía mediante la adición de un fármaco, tal como un coccidiostático, al alimento para controlar el crecimiento de coccidios en el tracto digestivo. Pero, los coccidiostáticos no deben ser utilizados de manera indiscriminada y deben seguirse las recomendaciones en forma precisa.

25 2. Espinilla (histomoniasis, enterohepatitis). La espinilla es una enfermedad aguda o crónica de las aves causada por protozoos, que afecta principalmente el intestino ciego y el hígado. La espinilla es causada por un parásito protozoario llamado *Histomonas meleagridis*. El organismo pasa a la material fecal de aves infectadas. Los organismos causantes de la espinilla que viven en forma libre no sobreviven mucho tiempo en la naturaleza, pero aquellos de los huevos del gusano cecal pueden sobrevivir durante años. Por lo tanto, la mayor transmisión de la espinilla se considera que se debe a la ingestión de huevos de gusanos cecales infectados. Los pollos se infectan con frecuencia sin mostrar signos de la enfermedad.

30 Los ácidos del lúpulo pueden prevenir o disminuir el crecimiento de las bacterias y protozoos anteriores, ayudando así en la prevención, previniendo o tratando las aves de corral susceptibles a las enfermedades anteriores.

La discusión anterior es descriptiva, ilustrativa y sirve como ejemplo y no debe ser tomada como una limitación del alcance definido por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para disminuir la producción de fuentes de carbono no oxidadas en un fluido del sistema digestivo del ganado que comprende: la adición de ácido del lúpulo a dicho alimento para el ganado,
- 5 administrar al ganado dicho alimento para ganado mezclo con ácido del lúpulo, la disminución de la producción de fuentes de carbono no oxidadas en un fluido del sistema digestivo del ganado en donde los ácidos del lúpulo se seleccionan de al menos uno de entre el grupo que consiste en ácidos beta, ácidos iso-alfa, ácidos tetrahydro iso-alfa.
2. El método de la reivindicación 1 en donde los ácidos beta se seleccionan de al menos uno del grupo que consiste en lupulona, colupulona, y adlupulona.
- 10 3. El método de la reivindicación 1 en donde la cantidad de ácido del lúpulo es de aproximadamente 1 ppm hasta aproximadamente 30 ppm del fluido del sistema digestivo.
4. El método de la reivindicación 1 en donde el ganado se selecciona del grupo que consiste en ganado vacuno, aves de corral, caballos, cerdos, y animales de zoológico.