

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 018**

51 Int. Cl.:

A61K 31/19 (2006.01)
A61K 31/20 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)
A23K 1/16 (2006.01)
A23K 1/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2005 E 05760668 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014 EP 1765318**

54 Título: **Ácidos grasos de cadena media aplicables como agentes anti-microbianos**

30 Prioridad:

30.06.2004 EP 04007106

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

20.11.2014

73 Titular/es:

**NUTRITION SCIENCES N.V./S.A. (100.0%)
BOOIEBOS 5
9031 DRONGEN, BE**

72 Inventor/es:

**BRUGGEMAN, GEERT;
MOLLY, KOEN y
DESCHEPPER, KATRIEN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 523 018 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 grasos de cadena media aplicables como agentes anti-microbianos

Campo técnico

5 La presente invención se refiere al uso de ácidos grasos de cadena media (MCFA) o sus sales o derivados de los mismos o mezclas de los mismos como inhibidores específicos de la contaminación y del crecimiento microbiano. En particular, la presente invención se refiere al uso de los ácidos caproico (C6), caprílico (C8) y cáprico (C10), las sales, ciertos derivados o mezclas de los mismos para inhibir el crecimiento de patógenos microbianos de transmisión alimentaria que son *Campylobacter* sp.

Antecedentes de la invención

10 Las cepas microbianas que tienen importancia para la salud animal y humana son *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, mohos, etc... Como ejemplo, *Campylobacter* está actualmente entre los enteropatógenos humanos más habituales del mundo, y provoca la campilobacteriosis. En la actualidad la campilobacteriosis es el principal caso de zoonosis de infección inflamatoria intestinal humana, seguido de salmonelosis y listeriosis. El espectro clínico de las enfermedades entéricas debidas a la infección por *Campylobacter* oscila desde diarrea no inflamatoria generalmente leve hasta diarrea inflamatoria grave con sangre fecal y leucocitos (Scott et al, 1997; Friedman et al, 2000; Oberhelman y Taylor, 2000). La incidencia europea informada para la campilobacteriosis humana varía de 9,5 casos cada año por 100.000 habitantes en España a 108 casos cada año por 100.000 en Escocia. El cálculo puede estar subestimado debido a que muchos casos no se informan y las herramientas de diagnóstico varían en los diferentes países. La incidencia todavía es creciente en la mayoría de países europeos.

20 *Campylobacter* es también una de las causas bacterianas más habituales de enfermedad diarreica en los Estados Unidos. Prácticamente todos los casos se dan en forma de sucesos aislados, esporádicos, no como parte de grandes brotes. La vigilancia activa por medio de la FoodNet de los EE.UU. indica que se diagnostican alrededor de 15 casos cada año por cada 100.000 personas. Muchos más casos quedan sin diagnosticar o sin informar, y se estima que la campilobacteriosis afecta a más de 1 millón de personas cada año, o un 0,5% de la población general.

25 Además, las infecciones por *Campylobacter* también están asociadas al síndrome de Guillain-Barre y a la artritis (Scott et al., 1997; Nachamkin et al., 1998). La mortalidad asociada a las infecciones por *Campylobacter* es relativamente baja, y no es necesario un tratamiento específico para la gran mayoría de pacientes. Aunque *Campylobacter* habitualmente no provoca la muerte, se ha estimado que cada año pueden morir aproximadamente 100 personas con infecciones por *Campylobacter*. Sin embargo, las infecciones por *Campylobacter* son, no obstante, problemas graves debido al número elevado de casos y a sus síntomas neurológicos, así como por los elevados costes sociales y económicos de la enfermedad. La comunidad paga un elevado coste económico debido a la pérdida de horas de trabajo, los costes médicos y de tratamientos (principalmente mediante el uso de fluoroquinolonas y macrólidos). Además, las infecciones sistémicas se dan especialmente en pacientes ancianos o en pacientes que están inmunodeprimidos, tales como los individuos infectados por HIV. Debido a que la vida media de los europeos se ha incrementado sistemáticamente, se pueden esperar más complicaciones graves de las infecciones por *Campylobacter*, en particular en los casos que implican a pacientes ancianos.

40 El problema de la incidencia creciente o continuamente elevada de las infecciones de transmisión alimentaria humanas no se puede resolver basándose en el presente conocimiento. El mantenimiento de estándares higiénicos incrementados ha tenido impacto sobre la salmonelosis, pero no sobre la campilobacteriosis. El conocimiento existente no resuelve estos problemas, ya que no se entienden los mecanismos mediante los cuales las bacterias zoonóticas invaden e infectan (Scott et al., 1997; Oberhelman y Taylor, 2000; Newell y Nachamkin, 1992).

45 Los brotes de campilobacteriosis se rastrean con frecuencia hasta leche o agua contaminada, mientras la causa más habitual de casos esporádicos es la ingestión de carne poco cocinada, p.ej. aves. Los pollos contaminados son, con mucho, los principales vehículos de la infección (Friedman et al., 2000; Corry y Atabay, 2001; Newell y Wagenaar, 2000). Las aves son un reservorio importante de *Campylobacter jejuni*, en las que las bacterias persisten dentro del tracto gastrointestinal. La epidemiología de *C. jejuni* en las explotaciones de pollos de engorde todavía está poco clara. En general, las aves se infectan aproximadamente a una edad de 3 semanas, pero siguen sin determinarse las fuentes y las vías de transmisión del microorganismo a los pollos de engorde en la granja. Los datos recién obtenidos han indicado varias fuentes de infección, que incluyen agua, aves salvajes y personal de granja (Corry y Atabay, 2001). Una vez que el microorganismo se introduce en la explotación, se propaga muy rápidamente, lo que conduce a la infección de casi todas las aves en un tiempo muy corto. Aunque el nivel informado de *Campylobacter* en los ciegos de los pollos varía entre 10^5 y 10^{10} /g, esta colonización masiva no induce ningún signo de la enfermedad. La elevada cantidad de *Campylobacter* en las heces de las aves causa una contaminación cruzada adicional de los cuerpos de los pollos negativos a *Campylobacter* en las plantas de procesamiento. Como resultado,

55 *Campylobacter* contamina un 50-80% de los cuerpos de los pollos crudos, dependiendo de la región geográfica en la que se lleve a cabo el estudio y el método usado. Este hecho, combinado con la dosis de infección humana relativamente baja, puede explicar por qué comer aves poco cocinadas provoca la mayoría de casos esporádicos de campilobacteriosis. Por lo tanto, uno de los desafíos es entender cómo bloquear o disminuir la colonización intestinal por *Campylobacter* en los animales zoonóticos hospedadores, p.ej. aves de corral. Los métodos actuales de higiene

y bioseguridad usados son mejoras de la bioseguridad en los viveros, una tecnología de exclusión competitiva o el uso de agua clorada (Corry y Atabay, 2001; Newell y Wagenaar, 2000). Pero son insuficientes para controlar o eliminar *Campylobacter* de la cadena alimentaria de las aves de corral. Otra estrategia se refiere a la administración preventiva de antibióticos (promotores del crecimiento) a los animales. Sin embargo, a lo largo de los años se ha incrementado la preocupación sobre el riesgo sanitario potencial de los residuos de los antibióticos y de las cepas resistentes de bacterias patógenas de las fuentes animales, y hay una presión creciente sobre los organismos legislativos para prohibir el uso de estos promotores del crecimiento (Barton, 1998; Dupont y Steele, 1987; Guillot, 1989; Prescott, 1997). Por lo tanto, se prevé una prohibición total de los antibióticos a final de 2005. Finalmente, otra aproximación alternativa para el control de la contaminación por *Campylobacter* puede ser la inmunización activa de las aves. Sin embargo, por el momento existe una información limitada sobre la función del sistema inmunitario de los pollos. Aunque algunos institutos de investigación internacionales están tratando este tema, un avance real de esta técnica sería para un futuro lejano. Por lo tanto, se necesitan urgentemente aproximaciones alternativas para controlar los patógenos de transmisión alimentaria y otra contaminación microbiana, en este caso *Campylobacter* sp., *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, etc... Un objetivo de la presente invención es proporcionar una aproximación alternativa para controlar la cantidad y el crecimiento de patógenos de transmisión alimentaria y otra contaminación microbiana.

En particular, la presente invención se dirige a proporcionar composiciones para el uso en métodos para reducir la cantidad y/o el crecimiento de patógenos de transmisión alimentaria y organismos microbianos que son *Campylobacter* sp. en productos consumibles (comestibles). Otro objetivo de la invención es proporcionar composiciones para el uso en métodos para reducir la cantidad y/o el crecimiento de patógenos de transmisión alimentaria y organismos microbianos que son *Campylobacter* sp. en animales o seres humanos. La presente invención se basa en el uso de los ácidos grasos de cadena media (MCFA) específicos ácido caproico (C6) y ácido caprílico (C8), las sales, amidas, ésteres, glicéridos o mezclas de los mismos, para el control de la contaminación microbiana y el crecimiento de *Campylobacter* sp. en seres humanos o animales.

Sumario

La presente invención se dirige a ácidos grasos de cadena media (MCFA), elegidos del grupo que consiste en ácido caproico (C6) y ácido caprílico (C8), las sales, amidas, ésteres, glicéridos o mezclas de los mismos, para el uso en la inhibición del crecimiento de patógenos microbianos según la reivindicación 1. La presente invención se refiere a la observación de que los ácidos grasos de cadena media específicos C6 y/o C8, sus sales o amidas, ésteres, glicéridos o mezclas en forma de una disolución o en una emulsión tienen efectos anti-microbianos sobre los patógenos microbianos, y permiten inhibir el crecimiento adicional de estos patógenos microbianos, y reducen sustancialmente su cantidad. Estos patógenos son *Campylobacter* sp.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere por lo tanto a los ácidos grasos de cadena media (MCFA), elegidos del grupo que consiste en ácido caproico (C6) y ácido caprílico (C8), las sales, amidas, ésteres, glicéridos o mezclas de los mismos, en una cantidad total en peso que es menor de un 5% y preferiblemente comprendida entre un 0,01% y un 5%, para el uso para inhibir el crecimiento y/o para reducir la cantidad de *Campylobacter* sp. Más en particular, los MCFA se usan en una cantidad total en peso comprendida entre un 0,01% y un 5%, preferiblemente entre un 0,05% y un 5%, preferiblemente entre un 0,1% y un 2,5%, más preferiblemente entre un 0,25% y un 1,5%, y lo más preferiblemente en una cantidad en peso de un 0,3% para inhibir el crecimiento de *Campylobacter* sp. El uso de estas cantidades de MCFA C6 y/o C8 no solamente permite inhibir el crecimiento de *Campylobacter* sp., sino que también permite destruir *Campylobacter* sp. Sorprendentemente, estas pequeñas cantidades de MCFA específicos son suficientes para proporcionar un buen efecto anti-microbiano, sin que tengan efectos adversos y/o perjudiciales sustanciales sobre la flora microbiana del tracto gastrointestinal. En la presente invención, se hace uso preferiblemente de una mezcla de diferentes ácidos grasos específicos. El solicitante ha descubierto que tal mezcla muestra propiedades antimicrobianas óptimas contra las cepas microbianas. En una realización preferida particular, los MCFA se usan en forma de ácidos grasos libres, o en forma de una mezcla de una o más de sus sales o amidas, ésteres, glicéridos, para impedir que la composición emita un olor desagradable. Los ácidos grasos que se pueden usar en esta invención incluyen ácidos grasos con un número impar de átomos de carbono. En una realización preferida, los MCFA usados comprenden una mezcla de C6 (ácido caproico, ácido hexanoico) y C8 (ácido caprílico, ácido octanoico), una mezcla de C8 y C10 (ácido caprílico, ácido decanoico), una mezcla de C6 y C10, o una mezcla de MCFA C6, C8 y C10. Los efectos antimicrobianos de los ácidos grasos y sus sales ya se conocían desde hace mucho tiempo, y los revisó J.J. Kabara (1978) en "The pharmacological effects of lipids". En esta revisión se discute que en las series homólogas de ácidos grasos, se ha descubierto que la eficacia bactericida se incrementa a medida que crece la longitud de la cadena. *E. coli* spp. y *Shigella* spp. parecen ser destruidas por concentraciones moderadas de jabones saturados de ácido láurico que contiene 12 átomos de carbono, y ácido graso estearílico que contiene 18 átomos de carbono.

Los ácidos grasos con una longitud de cadena de alrededor de 12 átomos de carbono parecen mostrar una actividad antimicrobiana óptima, mientras los ácidos grasos inferiores con 4-10 átomos de carbono parecen tener poco o ningún efecto germicida. El mecanismo según el cual los ácidos grasos ejercen la actividad antimicrobiana se ha documentado bien en bibliografía. La teoría aceptada actualmente es que la membrana celular microbiana lipídica es permeable para el ácido graso sin disociar, como consecuencia de lo cual el ácido graso es capaz de pasar a través de la membrana celular microbiana hacia el interior más alcalino. Debido a la mayor alcalinidad intracelular, el ácido

graso se disocia, lo que implica una disminución del pH intracelular por debajo del nivel de supervivencia. El ácido graso actúa así, de hecho, como un protonóforo, que incrementa la entrada de H^+ e implica que la salida de H^+ sea demasiado lenta para permitir que el pH intracelular se incremente de nuevo. Las propiedades fisicoquímicas de los ácidos grasos que les permiten actuar como protonóforos pueden variar, y dependen de numerosos parámetros. Los ejemplos de tales parámetros son la longitud de la cadena y el pKa del ácido graso, así como el medio fisicoquímico, las precipitaciones, el pH en el lugar de acción y la composición química de la cubierta microbiana, que determina el paso de los ácidos grasos a través de la membrana. A este respecto, el mejor rendimiento del ácido graso que contiene C6 y/o C8 átomos de carbono se atribuye a la permeabilidad extrema de la membrana celular microbiana para este ácido graso. Esto es inesperado, ya que Kabara (1978) describe que los ácidos grasos inferiores que contienen 4-10 átomos de carbono muestran poca actividad germicida. Un incremento del pH de 6,5 a 7,5 incrementó la concentración inhibitoria mínima de los ácidos grasos de cadena corta que contienen 6-8 átomos de carbono, y disminuyó las concentraciones mínimas de los dos MCFA que contienen 12-14 átomos de carbono (ácido láurico, mirístico). Sin embargo, no hay enseñanzas en Kabara (1978) con respecto a que los ácidos grasos que contienen C6 y/o C8 y/o C10 átomos de carbono sean capaces de controlar e incluso inhibir el crecimiento microbiano. Esta acción antimicrobiana particular de los MCFA específicos mencionados anteriormente (C6 y/o C8) a las concentraciones proporcionadas anteriormente no se ha descrito previamente para las cepas microbianas. Mediante la inhibición del crecimiento y mediante la destrucción de los patógenos microbianos, los patógenos microbianos respectivos ya no son capaces de provocar enfermedades intrínsecas de las células. De forma concluyente, los MCFA C6 y C8, o sus sales o derivados o mezclas de los mismos, inhiben el crecimiento de *Campylobacter* sp., en particular mediante la destrucción de *Campylobacter* sp. La invención proporciona el uso de una pequeña variedad específica de MCFA (C6 y/o C8) a las concentraciones bajas mencionadas anteriormente como agentes anti-microbianos. Por esta razón, los MCFA específicos se pueden aplicar en la asistencia sanitaria a seres humanos, p.ej. en caso de diarrea. Más adelante en la presente memoria, varios ejemplos demuestran la eficacia antimicrobiana del uso de C6 y/o C8 a las concentraciones mencionadas anteriormente como agentes anti-*Campylobacter* sp.

Descripción de las figuras

Las Figuras 1 a 3 ilustran el efecto de MCFA C10 (referencia) sobre el crecimiento y la supervivencia de diferentes cepas de *Campylobacter* sp. aisladas del ciego de aves de corral.

Las Figuras 4 a 6 ilustran el efecto de MCFA C8 sobre el crecimiento y la supervivencia de diferentes cepas de *Campylobacter* sp. aisladas del ciego de aves de corral.

Las Figuras 7 a 9 ilustran el efecto de MCFA C6 sobre el crecimiento y la supervivencia de diferentes cepas de *Campylobacter* sp. aisladas del ciego de aves de corral.

Descripción detallada de la invención

En una primera realización, la presente invención se refiere a ácidos grasos de cadena media (MCFA), elegidos del grupo que consiste en ácido caproico (C6) y ácido caprílico (C8), las sales, amidas, ésteres, glicéridos o mezclas de los mismos, para el uso para inhibir el crecimiento y/o para reducir la cantidad de *Campylobacter* sp. En una realización especialmente preferida, la presente invención se dirige al uso de ácidos grasos de cadena media (MCFA), elegidos del grupo que consiste en ácido caproico (C6) y ácido caprílico (C8), las sales, amidas, ésteres, glicéridos o mezclas de los mismos, para reducir la cantidad de *Campylobacter* sp. en más de un 25%, y preferiblemente más de un 50%, y aún más preferiblemente en más de un 75% y preferiblemente hasta un 100%. Tal como se usa en la presente memoria, el término "MCFA" se refiere a un ácido graso de cadena media, en el que dicho "ácido graso de cadena media" significa un ácido graso saturado, ácido graso insaturado, o mezcla de los mismos, que tiene de 6 a 10 átomos de carbono. "Ácido graso saturado de cadena media," tal como se usa en la presente memoria, significa C6 (caproico), C8 (caprílico), C10 (cáprico), o cualquier mezcla de los mismos. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "sal de MCFA" se refiere a una sal del ácido graso libre. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "ácido graso libre" se refiere a un ácido graso sin derivatizar, es decir, un ácido graso que no se ha convertido en una sal, una amida, un éster, etc. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "derivado de MCFA" se refiere a un ácido graso de cadena media cuyo grupo ácido carboxílico se convierte de manera reversible en otro grupo para formar amidas, ésteres, glicéridos. En esta memoria descriptiva, la expresión derivado de MCFA excluye la sal de MCFA. En particular, la invención se refiere a ácidos grasos de cadena media (MCFA), elegidos del grupo que consiste en ácido caproico (C6), ácido caprílico (C8), las sales, amidas, ésteres, glicéridos o mezclas de los mismos, para el uso para inhibir el crecimiento de *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter laris*, *Campylobacter upsaliensis*, y/u otro *Campylobacter* sp. En una realización, la invención se dirige al uso de ácidos grasos de cadena media (MCFA), elegidos del grupo que consiste en ácido caproico (CG), ácido caprílico (C8), las sales, amidas, ésteres, glicéridos o mezclas de los mismos, en una cantidad total en peso que es menor de un 5 %, y preferiblemente menor de un 3%, menor de un 1%, o incluso menor de un 0,1% para inhibir el crecimiento y/o para reducir la cantidad de *Campylobacter* sp. En una realización preferida, el ácido caproico (C6), sales o amidas, ésteres, glicéridos del mismo se usan en una cantidad en peso comprendida entre un 0,01% y un 5%, preferiblemente entre un 0,05 % y un 5%, preferiblemente entre un 0,1% y un 2,5%, más preferiblemente entre un 0,25% y un 1,5%, y lo más preferiblemente en una cantidad en peso de un 0,3%. En otra realización preferida, el ácido caprílico (C8), sales o derivados de los mismos se usan en una cantidad en peso

comprendida entre un 0,01% y un 5%, preferiblemente entre un 0,05 % y un 5%, preferiblemente entre un 0,1% y un 2,5%, más preferiblemente entre un 0,25% y un 1,5%, y lo más preferiblemente en una cantidad en peso de un 0,3%. En otra realización preferida, se usa una mezcla de ácido caproico (C6) y ácido caprílico (C8). La presente invención también abarca el uso de una mezcla de ácido caprílico (C8) y ácido cáprico (C10). En otra realización preferida, se usa una mezcla de ácido caproico (C6) y ácido cáprico (C10). Además, en otra realización, la invención se puede referir al uso de una mezcla de ácido caproico (C6), ácido caprílico (C8) y ácido cáprico (C10). Se pueden usar diversas mezclas de MCFA ácido caproico (C6), ácido caprílico (C8) y ácido cáprico (C10), y las proporciones relativas de los MCFA en tales mezclas, en la presente invención. Preferiblemente, la proporción de C6 a C8 en una mezcla de C6/C8 está comprendida entre 2:1 y 1:2, y preferiblemente es 1:1. En otra realización preferida, la proporción de C8 a C10 en una mezcla C8/C10 está comprendida entre 2:1 y 1:2, y preferiblemente es 1:1. En otra realización, la proporción de C6 a C10 en una mezcla C6/C10 está comprendida entre 2:1 y 1:2, y preferiblemente es 1:1. En otra realización preferida, la proporción de C6 a C8 a C10 en una mezcla C6/C8/C10 puede ser 1:1:2 ó 1:2:1 ó 2:1:1 ó 1:2:2 ó 2:1:2 ó 2:2:1 ó 1:1:1, y preferiblemente es 1:1:1. En una realización preferida, se usa ácido caproico (C6) y ácido caprílico (C8) en cantidades aproximadamente iguales en peso. Preferiblemente, se usa ácido caproico (C6) y ácido caprílico (C8) en una cantidad total en peso comprendida entre un 0,01% y un 5%, preferiblemente entre un 0,05% y un 5%, preferiblemente entre un 0,1% y un 2,5%, más preferiblemente entre un 0,25% y un 1,5%, y lo más preferiblemente en una cantidad en peso de un 0,3%. La presente invención se refiere además, en otra realización preferida, al uso de ácido caprílico (C8) y ácido cáprico (C10) en cantidades aproximadamente iguales en peso. Preferiblemente, se usa ácido caprílico (C8) y ácido cáprico (C10) en una cantidad total en peso comprendida entre un 0,01% y un 5%, preferiblemente entre un 0,05% y un 5%, preferiblemente entre un 0,1% y un 2,5%, más preferiblemente entre un 0,25% y un 1,5%, y lo más preferiblemente en una cantidad en peso de un 0,3%. En otra realización preferida, se usa ácido caproico (C6), ácido caprílico (C8), y ácido cáprico (C10) en cantidades aproximadamente iguales en peso. Preferiblemente, se usa ácido caproico (C6), ácido caprílico (C8) y ácido cáprico (C10) en una cantidad total en peso comprendida entre un 0,01% y un 5%, preferiblemente entre un 0,05% y un 5%, preferiblemente entre un 0,1% y un 2,5%, más preferiblemente entre un 0,25% y un 1,5%, y lo más preferiblemente en una cantidad en peso de un 0,3%. En otra realización, los MCFA usados de acuerdo con la presente invención se pueden usar en diversas formas, en las que los MCFA se usan en forma de MCFA libres, en forma de mono-, di- y/o triglicéridos, en forma de sales de NH^- , Na^+ , K^+ y/o Ca^{2+} o en forma de una emulsión. En una realización adicional, los MCFA se usan en combinación con otros MCFA, tales como ácido láurico (C12) y mirístico (C14), otros agentes antifúngicos o con otros ácidos (grasos) (orgánicos o inorgánicos) o con aditivos, tales como extractos aromáticos y vegetales. Los ejemplos de otros ácidos orgánicos incluyen ácidos carboxílicos C1-12 seleccionados del grupo que comprende ácidos carboxílicos sin sustituir tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido valerianoico, y ácido caproico, ácidos carboxílicos sustituidos tales como ácido adípico, ácido maleico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido glucónico, ácido málico, y ácido ascórbico, que incluyen ácidos carboxílicos cíclicos tales como ácido picolínico. El componente de ácido orgánico puede ser un único ácido carboxílico sin sustituir, un único ácido carboxílico sustituido, una mezcla de ácidos carboxílicos sin sustituir, una mezcla de ácidos carboxílicos sustituidos y una mezcla de ácidos carboxílicos sin sustituir y ácidos carboxílicos sustituidos que incluyen ácidos carboxílicos saturados, insaturados, cíclicos y alifáticos, y complejos metálicos y sales de los mismos. Además, se pueden usar formas racémicas individuales y mezclas racémicas. Los ejemplos de ácidos inorgánicos incluyen ácidos inorgánicos fuertes en cantidades pequeñas tales como ácido perclórico, ácido yodhídrico, ácido bromhídrico, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, y ácido nítrico, y ácidos inorgánicos débiles tales como ácido fosfórico, ácido fluorhídrico, ácido hipocloroso, y ácido nitroso. En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de ácidos grasos de cadena media (MCFA), elegidos del grupo que consiste en ácido caproico (C6), ácido caprílico (C8), y ácido cáprico (C10), las sales, derivados o mezclas de los mismos, preferiblemente en una cantidad total en peso que es menor de un 5%, y preferiblemente comprendida entre un 0,01% y un 5%, preferiblemente entre un 0,05% y un 5%, preferiblemente entre un 0,1% y un 2,5%, más preferiblemente entre un 0,25% y un 1,5%, y lo más preferiblemente en una cantidad en peso de un 0,3% para el control y la regulación del ecosistema microbiano en el tracto gastrointestinal de cualquier animal o ser humano.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición comestible para el uso para inhibir el crecimiento y/o para reducir la cantidad de patógenos microbianos que comprende un suplemento alimenticio que contiene ácidos grasos de cadena media (MCFA) elegidos del grupo que consiste en ácido caproico (C6) y ácido caprílico (C8), las sales, amidas, ésteres, glicéridos o mezclas de los mismos, por lo que dichos MCFA están presentes en el suplemento alimenticio en una cantidad total en peso que es menor de un 5%, y preferiblemente comprendida entre un 0,01% y un 5%, preferiblemente entre un 0,05% y un 5%, preferiblemente entre un 0,1% y un 2,5%, más preferiblemente entre un 0,25% y un 1,5%, y lo más preferiblemente en una cantidad en peso de un 0,3%. La expresión "composición comestible", según la invención, se debe considerar que es un alimento o comida, y así consumible por un animal o ser humano. En una realización especialmente preferida, la presente composición es capaz de reducir la cantidad de patógenos microbianos en más de un 25%, y preferiblemente en más de un 50%, y aún más preferiblemente en más de un 75%, y preferiblemente hasta un 100%. Los MCFA presentes en la composición se pueden presentar en el tipo de mezclas, proporciones, cantidades y en los tipos de formulaciones indicados anteriormente. Preferiblemente, la composición comprende un suplemento alimenticio en el que se usa

una mezcla de C6, C8 y C10. Más preferiblemente, la composición comprende un suplemento alimenticio en el que ácido caproico (C6) y ácido caprílico (C8) están presentes en cantidades aproximadamente iguales en peso, y preferiblemente en una cantidad en peso comprendida entre un 0,01% y un 5%, preferiblemente entre un 0,05% y un 5%, preferiblemente entre un 0,1% y un 2,5%, más preferiblemente entre un 0,25% y un 1,5%, y lo más preferiblemente en una cantidad en peso de un 0,3%. En otra realización, la composición comprende un suplemento alimenticio en el que ácido caprílico (C8) y ácido cáprico (C10) están presentes en cantidades aproximadamente iguales en peso, y preferiblemente en una cantidad en peso comprendida entre un 0,01% y un 5%, preferiblemente entre un 0,05% y un 5%, preferiblemente entre un 0,1% y un 2,5%, más preferiblemente entre un 0,25% y un 1,5%, y lo más preferiblemente en una cantidad en peso de un 0,3%. En otra realización, la composición comprende un suplemento alimenticio en el que ácido caproico (C6) y ácido cáprico (C10) están presentes en cantidades aproximadamente iguales en peso, y preferiblemente en una cantidad en peso comprendida entre un 0,01% y un 5%, preferiblemente entre un 0,05% y un 5%, preferiblemente entre un 0,1% y un 2,5%, más preferiblemente entre un 0,25% y un 1,5%, y lo más preferiblemente en una cantidad en peso de un 0,3%. En otra realización preferida, la concentración de MCFA de la composición comprende entre 100-3000 ppm, preferiblemente entre 300 y 2000 ppm, preferiblemente entre 500 y 1500 ppm y aún más preferiblemente alrededor de 1200 ppm. Tal como se usa en la presente memoria, el término "animales" se refiere a animales de granja que incluyen, pero sin limitación, ganado tal como rumiantes, ovejas, cerdos, caballos, y aves de corral, y su progenie, tales como lechones, terneros, corderos, potros y pollos. También los peces, tales como anguilas, carpas, truchas, trucha arco iris, jurel, besugo, salmón plateado, carpas doradas, carpa coloreada, peces tropicales; mariscos; crustáceos; son ejemplos de los animales cubiertos por la composición de la presente invención. También las mascotas, tales como perros, gatos, conejos, hámsteres, y su progenie, son ejemplos de los animales cubiertos por la composición de la presente invención. Según otra realización de la presente invención, se proporciona una composición para el uso como alimento para animales productores de leche tales como, pero sin limitación, vacas, ovejas, cabras y caballos. La presente composición permite estimular un ecosistema microbiano con un buen funcionamiento y bien equilibrado en el tracto gastrointestinal de un animal. El control del ecosistema microbiano en el tracto gastrointestinal de un animal permite obtener mejores rendimientos, y mejora la salud y el bienestar de los animales. Los mejores rendimientos se reflejan en un mejor aumento de peso diario y un menor índice de transformación del alimento en los animales en crecimiento. La expresión "transformación del alimento" se usa para describir la eficacia de la asimilación del alimento por el animal, y se refiere a las unidades de alimento consumidas dividido por las unidades de aumento de peso del animal a lo largo de un periodo de tiempo específico. El "índice de transformación del alimento" es la proporción de la cantidad de alimento consumida respecto del aumento de peso de un animal. El uso de un intervalo específico de MCFA a las concentraciones mencionadas anteriormente según la presente invención mejora así las actividades de transformación del alimento de los animales sin una estimulación sustancial o significativa concomitante del consumo de alimentos. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "mejorar la transformación del alimento" y las expresiones afines, tales como "mejora de la transformación del alimento", se refieren a mejorar la eficacia de utilización de los alimentos y/o mejorar la velocidad de crecimiento. Es decir, de acuerdo con la presente invención, los animales tratados (en comparación con los animales sin tratar) pueden tener sustancialmente el mismo consumo de alimentos y crecer a una velocidad de crecimiento incrementada, pueden tener un consumo disminuido de alimentos y crecer sustancialmente a la misma velocidad de crecimiento, o pueden tener un consumo disminuido de alimentos y crecer a una velocidad de crecimiento incrementada. El término "crecimiento", tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un aumento de peso.

En el ser humano, el control del ecosistema microbiano en el tracto gastrointestinal también permite mejorar la salud y el bienestar. Más en particular, permite reducir el riesgo de campilobacteriosis en los seres humanos. Además, la presente composición permite controlar la cantidad de *Campylobacter* sp. en los productos comestibles que se obtienen a partir de un animal.

La expresión "producto comestible", tal como se usa en la presente memoria, comprende un producto que se obtiene a partir de un animal y que es consumible y digerible, tal como, por ejemplo, leche, carne, huevos, queso, nata, mantequilla, pero también cualquier producto adicional preparado mediante el uso de estos productos comestibles como ingredientes. El presente método implica el control del ecosistema microbiano en el tracto gastrointestinal de un animal y la reducción de la cantidad de *Campylobacter* sp. en el animal. Como consecuencia de ello, se puede reducir el número de animales contaminados por *Campylobacter* sp. y/o su grado de contaminación, y se puede reducir significativamente la entrada de *Campylobacter* sp. en la cadena alimentaria y la contaminación cruzada adicional en las plantas de procesamiento.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Influencia de MCFA sobre el crecimiento y la supervivencia de *C. jejuni* y *C. coli*.

Se incluyeron ocho cepas de *Campylobacter* en este estudio. Dos cepas (*C. jejuni* LMG 6444T I ATCC 33560 y *C.*

coli LMG 6440T I ATCC 33559) se obtuvieron de la colección de bacterias BCCM™/LMG (Universidad de Gante, Gante, Bélgica). También se ensayaron en este estudio seis cepas de *Campylobacter* no relacionadas (*C. jejuni* y *E. coli*), aisladas a partir de productos de aves de corral belgas e identificadas a nivel de especie mediante PCR múltiple. También se ensayaron tres cepas de control de antibiograma 25, *S. aureus* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 29212 y *E. coli* ATCC 25923. Se prepararon tres diluciones a un décimo de una suspensión del 10% del producto de MCFA (C_6 y C_8) en agua destilada. Se usaron C_6 y C_8 en cantidades iguales (50/50) en peso. La suspensión del 10% contiene así un 5% de C_6 y un 5% de C_8 . Para obtener las concentraciones deseadas, se pipetearon 1,5, 0,75 y 0,36 ml de estas diluciones en placas petri y se mezclaron con cuidado con 15 ml de medio de cultivo fundido. Los medios usados fueron medio Mueller-Hinton II (BBL) con un pH 7,2. Las cepas de *Campylobacter* se cultivaron en caldo de infusión de cerebro y corazón, y se incubaron a 37 °C en condiciones micro-aerobias evacuando el 80% de la atmósfera normal y 35 introduciendo una mezcla de gases del 8% de CO₂, 8% de H₂, 84% de N₂ en el recipiente. Se prepararon inóculos diluyendo los cultivos de caldo de infusión de cerebro y corazón (Oxoid, Basingstoke, R.U.) de la noche en solución salina tamponada a una densidad de 0,5 en la escala de turbidez de McFarland, y se diluyeron 40 veces antes de inocularlos. Las placas se sembraron con aproximadamente 1×10^5 UFC con un inoculador de Steers. Las placas de control de ambos medios sin el producto se inocularon al final del procedimiento. Todas las placas se incubaron a 37 °C en una atmósfera micro-aerobia. Las lecturas se llevaron a cabo después de 48 h. La CIM se registró como la concentración más baja que inhibió completamente el crecimiento bacteriano, por lo que se ignoraron las turbideces tenues de crecimiento o colonias individuales.

Tabla 1: Valor de CIM (%) del producto de MCFA (C_6 - C_8) sobre diferentes cepas de *Campylobacter*

| Cepa | Número | CIM |
|------------------|------------|-------|
| <i>C. jejuni</i> | ATCC 33560 | 0,01 |
| <i>C. coli</i> | ATCC 33559 | 0,01 |
| <i>C. jejuni</i> | KH-03-1 | 0,01 |
| <i>C. jejuni</i> | KH-03-2 | 0,01 |
| <i>C. jejuni</i> | KH-03-3 | 0,005 |
| <i>C. jejuni</i> | KH-03-4 | 0,01 |
| <i>C. jejuni</i> | KH-03-5 | 0,01 |
| <i>C. coli</i> | KH-03-6 | 0,005 |

Los resultados de la Tabla 1 ilustran claramente que MCFA C_6 y C_8 específicos a las concentraciones usadas tienen un efecto inhibitorio a pH 7,2 sobre *C. jejuni* y *C. coli*. Las cepas bacterianas se destruyeron.

Ejemplo 2: Influencia de MCFA sobre *Campylobacter*

Se prepararon tres diluciones a un décimo de una mezcla de MCFA del 5% (C_6 y C_8) (almacenada a 7 °C) en agua destilada. Se usaron C_6 y C_8 en cantidades iguales (50/50) en peso. La suspensión del 5% contuvo así un 2,5% de C_6 y un 2,5% de C_8 . Para obtener las concentraciones deseadas, se pipetearon 1,5, 0,75 y 0,36 ml de estas diluciones en placas petri y se mezclaron con cuidado con 15 ml de medio de cultivo fundido. Se usó el medio Mueller-Hinton II (BBL) con un pH de 7,2. Las cepas conservadas (*Campylobacter jejuni* ATCC 33560, dos cepas de control de antibiograma, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y 25 *Escherichia coli* ATCC 25923) se cultivaron en caldo de infusión de cerebro y corazón. Se prepararon inóculos a partir de cultivos en caldo de 16 a 26 h durante la noche incubados a 37 °C. Estos se obtuvieron mediante cultivo en suspensión en solución salina estéril en un fotómetro adaptado para medidas de la escala de McFarland (bioMerieux). Las disoluciones que coincidieron con 0,5 McFarland se diluyeron a un décimo en solución salina y se inocularon en las placas de MCFA y de control mediante el uso de un inoculador multipunto Denley (Mast). De esta manera, se inocularon aproximadamente 10.000 unidades formadoras de colonias de cada cepa en las placas. Todas las placas se incubaron a 37 °C. La incubación se llevó a cabo en condiciones aerobias, en condiciones micro-aerobias (evacuando un 80% de la atmósfera normal e introduciendo una mezcla de gases del 8% de CO₂, 8% de H₂, 84% de N₂ en el recipiente) o en condiciones anaerobias (en H₂ + CO₂). Las lecturas se llevaron a cabo después de 48 h. La concentración inhibitoria mínima (CIM) se registró como la concentración más baja que inhibió completamente el cultivo, por lo que se ignoraron las turbideces tenues de crecimiento o colonias individuales. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: CIM (%) de MCFA contra el patógeno de transmisión alimentaria *Campylobacter*

| | Microorganismo | | | |
|----------------------------|------------------|----------------------|--|------------------|
| | <i>E. coli</i> * | <i>E. faecalis</i> * | | <i>C. jejuni</i> |
| Condiciones aerobias | 0,025 | 0,012 | | - |
| Condiciones micro-aerobias | 0,025 | 0,012 | | 0,0025 |
| Condiciones anaerobias | 0,025 | 0,005 | | <0,0012 |

* cepas de control

5 La cepa de *Campylobacter* ensayada no creció en condiciones aerobias. La CIM para ambos patógenos de transmisión alimentaria osciló desde un 0,025% hasta menos de un 0,0012% de MCFA. Esto indica que el suministro de MCFA específicos proporciona un efecto inhibitorio intenso hacia *Campylobacter*. El crecimiento se inhibe sorprendentemente, y los respectivos microorganismos son destruidos por los MCFA. Esto indica que los MCFA C₆ y C₈ a las cantidades aplicadas son especialmente útiles para el control de estos tipos de patógenos de transmisión alimentaria.

10 Ejemplo 3: Efecto de MCFA sobre el crecimiento y la supervivencia de *Campylobacter* sp. aislado del ciego de aves de corral

En este ejemplo, se determinaron los valores de CIM de diferentes MCFA contra *Campylobacter* sp. aislado del ciego de aves de corral. Se prepararon tres diluciones a un décimo de una suspensión del 10% de tres tipos de MCFAs (C₆, C₈ y C₁₀) en agua destilada. Para obtener las concentraciones deseadas, se pipetearon 1,5, 0,75 y 0,36 ml de estas diluciones en placas petri y se mezclaron con cuidado con 15 ml de medio de cultivo fundido. Se usó un medio de fermentación adecuado con un pH de 5,0. Las cepas de *Campylobacter* aisladas se cultivaron en un medio de fermentación adecuado y se incubaron a 37 °C en condiciones micro-aerobias evacuando el 80% de la atmósfera normal e introduciendo una mezcla de gases de un 8% de CO₂, 8% de H₂, 84% de N₂ en el recipiente. Se prepararon inóculos diluyendo los cultivos en solución salina tamponada a una densidad de 0,5 en la escala de turbidez de McFarland y se diluyeron 40 veces antes de inocularlos. Las placas se sembraron con el inóculo. Las placas de control de los medios sin el producto se inocularon al final del procedimiento. Todas las placas se incubaron a 37 °C en una atmósfera adecuada. Las lecturas se llevaron a cabo después de 48 h. Se realizó el recuento de *Campylobacter* tras la incubación. Los resultados de los experimentos mediante el uso de MCFA C₁₀ se muestran en las Figuras 1-3. Los resultados de los experimentos mediante el uso de Ca se muestran en las Figuras 4-6. Los resultados de los experimentos mediante el uso de C₆ se muestran en las Figuras 7-9. Estas figuras representan el número de unidades formadoras de colonias (UFC)/ml de la cepa de *Campylobacter jejuni* VC 5 (Fig. 1, 4, 7), la cepa de *Campylobacter jejuni* VC 6 (Fig. 2, 5, 8), y la cepa de *Campylobacter jejuni* VC 7 (Fig. 3, 6, 9) a diversas concentraciones de MCFA y en dos momentos diferentes (0 y 180 minutos). Los resultados de estos experimentos demostraron que, a las concentraciones ensayadas, los MCFA C₆, C₈ y C₁₀ muestran actividades antimicrobianas contra diferentes cepas de *Campylobacter*. También se demostró que en las condiciones de ensayo de este experimento, el MCFA C₁₀ mostró un efecto antimicrobiano más intenso en comparación con C₈, mientras C₈ mostró un efecto antimicrobiano más intenso en comparación con el MCFA C₆ sobre las cepas ensayadas de *Campylobacter*.

Referencias

- BARTON, M. D. (1998). Does the use of antibiotics in animals affect human health. *Aust. Vet. J.*, 76, 177.
- CORRY, J.E.L. y ATABAY, H.I. (2001). Poultry as source of *Campylobacter* and related organisms. *J. Appl. Microbiol.*, 90, 96S-1 14S.
- 5 DUPONT1 H. L. y STEELE, J. H. (1987). Use of antimicrobial agents in feeds: implications for human health. *Rev. Infect. Dis.*, 9, 447.
- FRIEDMAN, C.R., NEIMANN, J., WEGENER, C. y TAUXE, R. V. (2000). Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. En: NACHAMKIN, I. y BLASER, MJ. (eds.). *Campylobacter*. Washington, American Society for Microbiology, 121-138.
- 10 GUILLOT, J. F. (1989). Apparition et evolution de la resistance bacterienne aux antibiotiques. *Ann. Rech. Vet.*, 20, 3.
- KABARA, J. (1978). Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents - a review. En: KABARA, J. (ed.). *The pharmaceutical effects of lipids*, AOCS, Champaign, 11 1, EE.UU., 1.
- NACHAMKIN, I., ALLOS, B.M. y HO, T. (1998). *Campylobacter* species and Guillain-Barre syndrome. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1 1, 555-567.
- 15 NEWELL, D.G. y NACHAMKIN, I. (1992). Immune responses directed against *Campylobacter jejuni*. En: NACHAMKIN, I., BLASER, MJ. y TOMPKINS1 L.S. (eds.). *Current status and future trends*. Washington, American Society for Microbiology, 201-206.
- NEWELL, D.G. y WAGENAAR, J.A. (2000). Poultry infections and their control at the farm level. En: NACHAMKIN, I. y BLASER, MJ. (eds.). *Campylobacter*. Washington, American Society for Microbiology, 497-509
- 20 OBERHELMAN, R.A. y TAYLOR, D.N. (2000). *Campylobacter* infections in developing countries. En: NACHAMKIN1 I. y BLASER, MJ. (eds.). *Campylobacter*. Washington, American Society for Microbiology, 139-153
- PRESCOTT1 J. F. (1997). Antibiotics: miracle drugs or pig food. *Can. Vet. J.*, 38, 763.
- 25 SCOTT1 D.A., BAQAR1 S., PAZZAGLIA1 G., GUERRY1 P. y BURR, D.H. (1997). Vaccines against *Campylobacter jejuni*. En: LEVINE, M. M., WOODROW1 G. C1 KAPER1 J. B. y COBON, G. S. (eds.). *New generation vaccines*. Nueva York, Marcel Dekker Inc., 885-896.
- WOOD, R.L, POSPISCHIL, A. y ROSE, R. (1989). Distribution of persistent *Salmonella typhimurium* infection in internal organs of swine. *American Journal of Veterinary Research*, 50, 1015-1021.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición para el uso para inhibir el crecimiento y/o para reducir la cantidad de *Campylobacter* sp. en seres humanos o animales, por lo que dicha composición comprende ácidos grasos de cadena media (MCFA) o amidas, ésteres, glicéridos, sales o mezclas de los mismos, y dicho MCFA se elige del grupo que consiste en ácido caproico y ácido caprílico, caracterizada porque los MCFA están presentes en la composición en una cantidad total en peso comprendida entre un 0,01% y un 5%.
2. Una composición para el uso según la reivindicación 1, en la que dichos MCFA o amidas, ésteres, glicéridos, sales o mezclas de los mismos se usan en una cantidad total en peso comprendida entre un 0,1% y un 2,5%.
- 10 3. Una composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además ácido cáprico o una amida, éster, glicérido o sal del mismo.
4. Una composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque dicho *Campylobacter* sp. es *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter laris* y/o *Campylobacter upsaliensis*.
5. Una composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes para reducir la cantidad de patógenos microbianos en más de un 25%.
- 15 6. Una composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dichos MCFA o amidas, ésteres, glicéridos, sales o mezclas de los mismos se usan en una cantidad total en peso de un 0,3%.
7. Una composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende una mezcla de ácido caproico y ácido caprílico o amidas, ésteres, glicéridos, sales o mezclas de los mismos.
- 20 8. Una composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes 3 a 6, que comprende una mezcla de ácido caprílico y ácido cáprico o amidas, ésteres, glicéridos, sales o mezclas de los mismos.
9. Una composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes 3 a 6, que comprende una mezcla de ácido caproico y ácido cáprico o amidas, ésteres, glicéridos, sales o mezclas de los mismos.
10. Una composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1 a 7, en la que la proporción de ácido caproico respecto de ácido caprílico está comprendida entre 2:1 y 1:2.
- 25 11. Una composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes 3 a 6 y 8, en la que la proporción de ácido caprílico respecto de ácido cáprico está comprendida entre 2:1 y 1:2.
12. Una composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 y 9, en la que la proporción de ácido caproico respecto de ácido cáprico está comprendida entre 2:1 y 1:2.
- 30 13. Una composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, que comprende una mezcla de ácido caproico, ácido caprílico y ácido cáprico.
14. Una composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que los MCFA se usan en forma de MCFA libres, en forma de mono-, di- y/o triglicéridos, en forma de sales de NH_4^{+} -, Na^{+} -, K^{+} - y/o Ca^{2+} - o en forma de una emulsión.

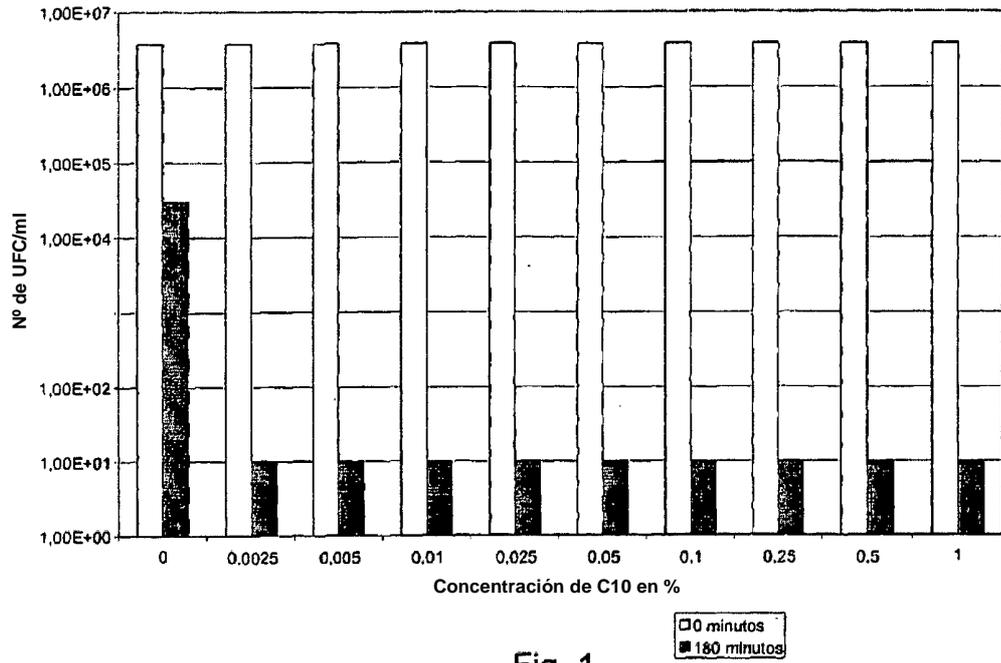


Fig. 1

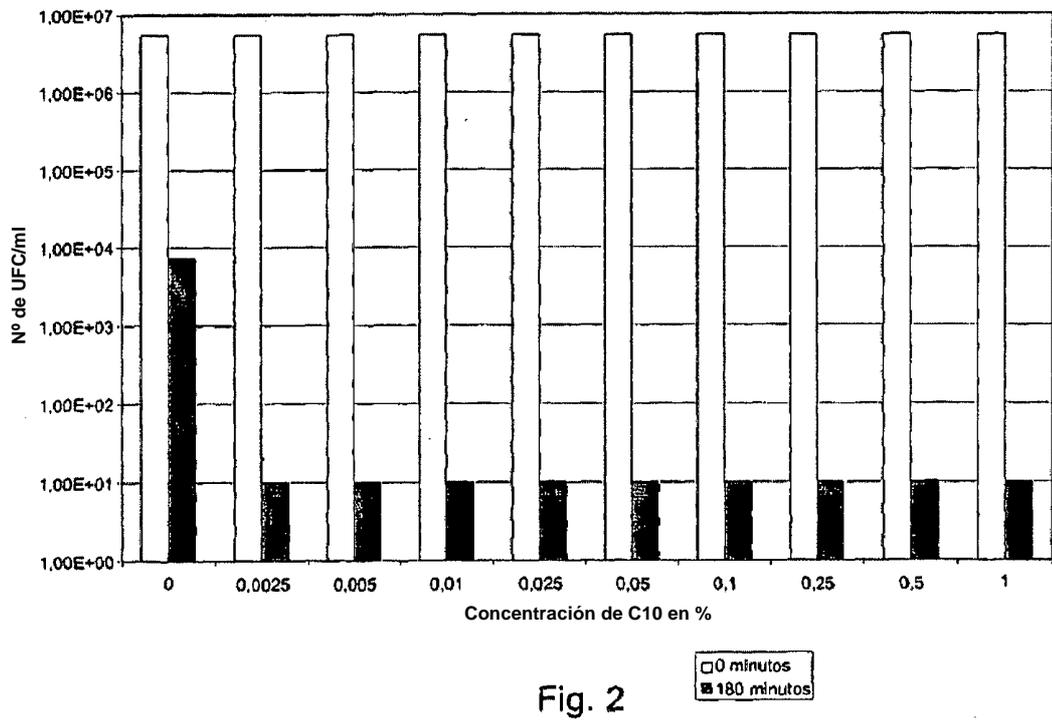


Fig. 2

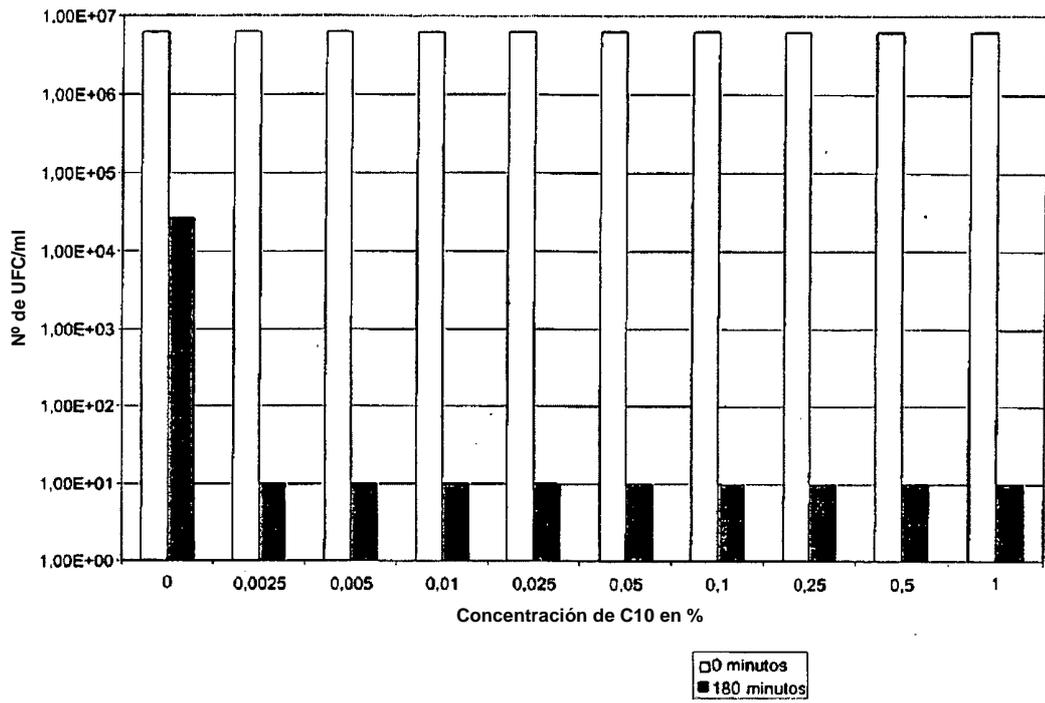


Fig. 3

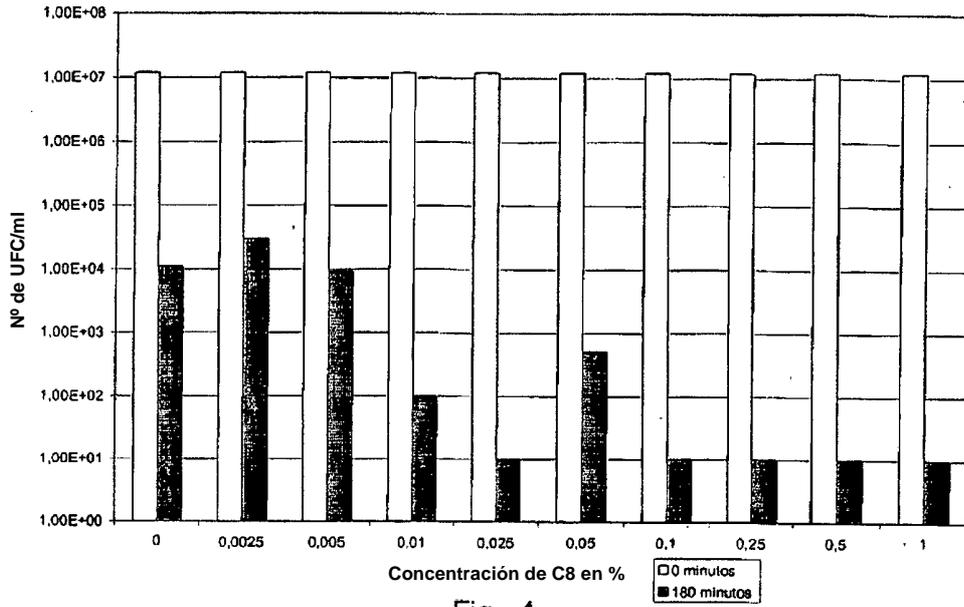


Fig. 4

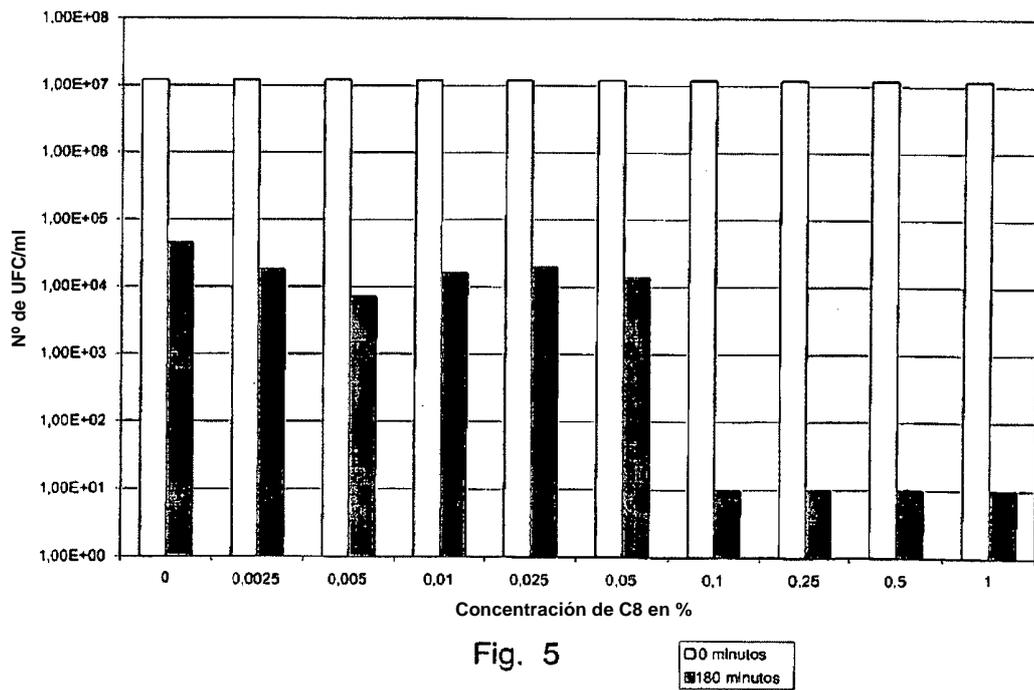


Fig. 5

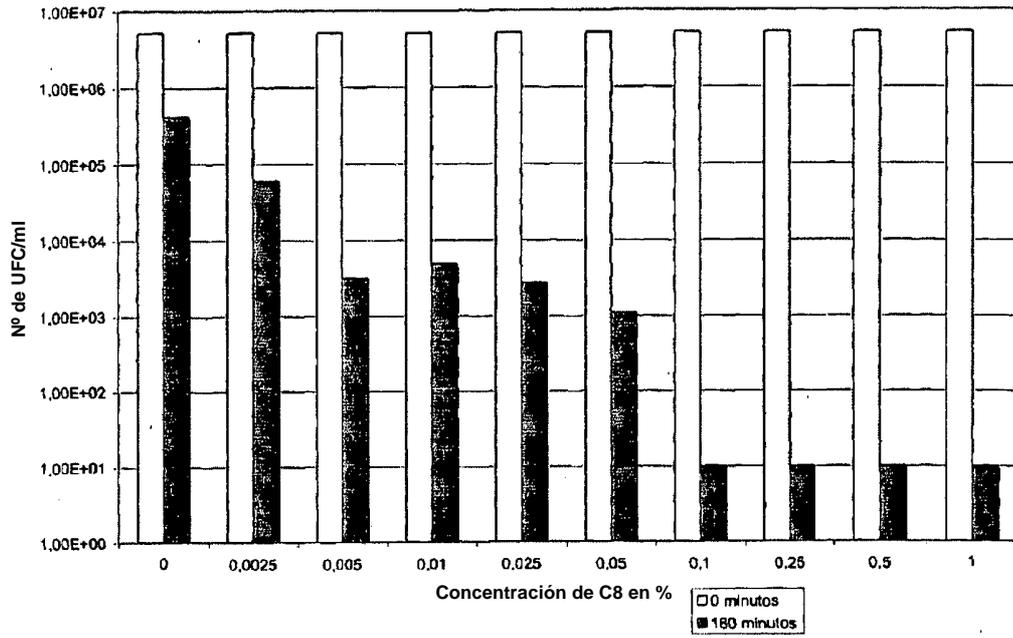


Fig. 6

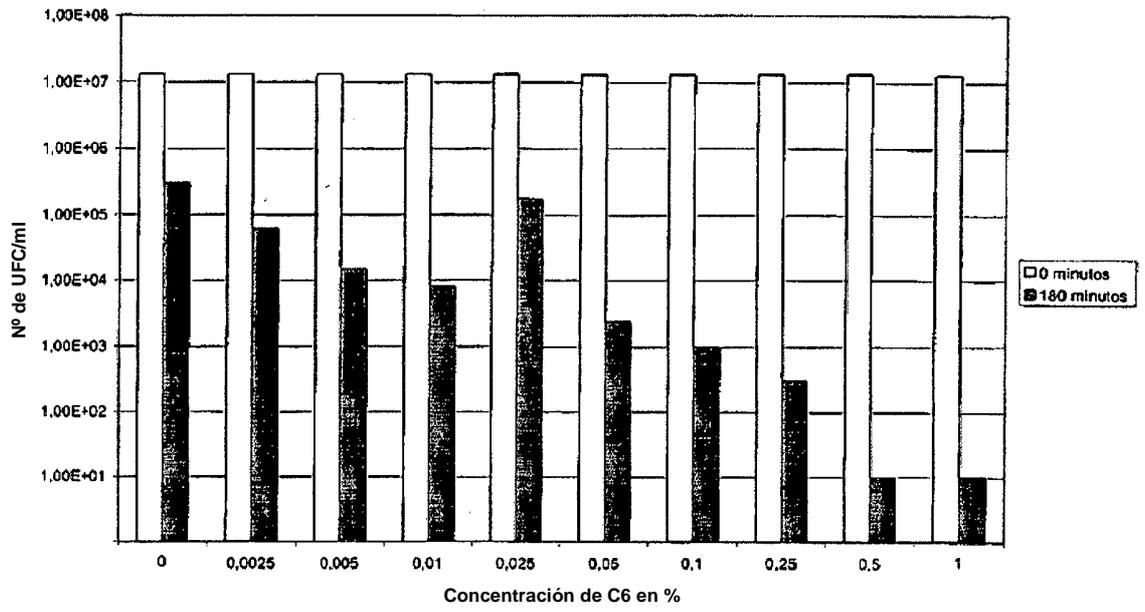


Fig. 7

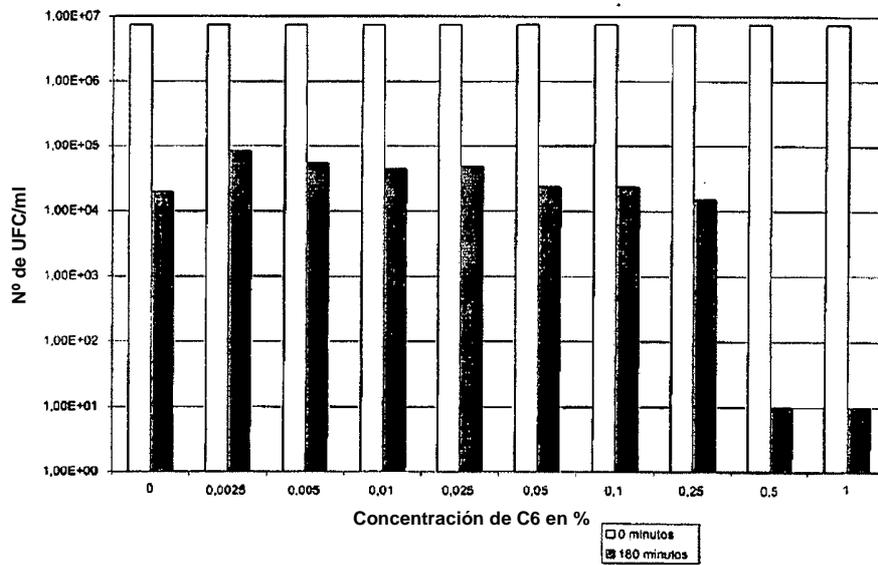


FIG. 8

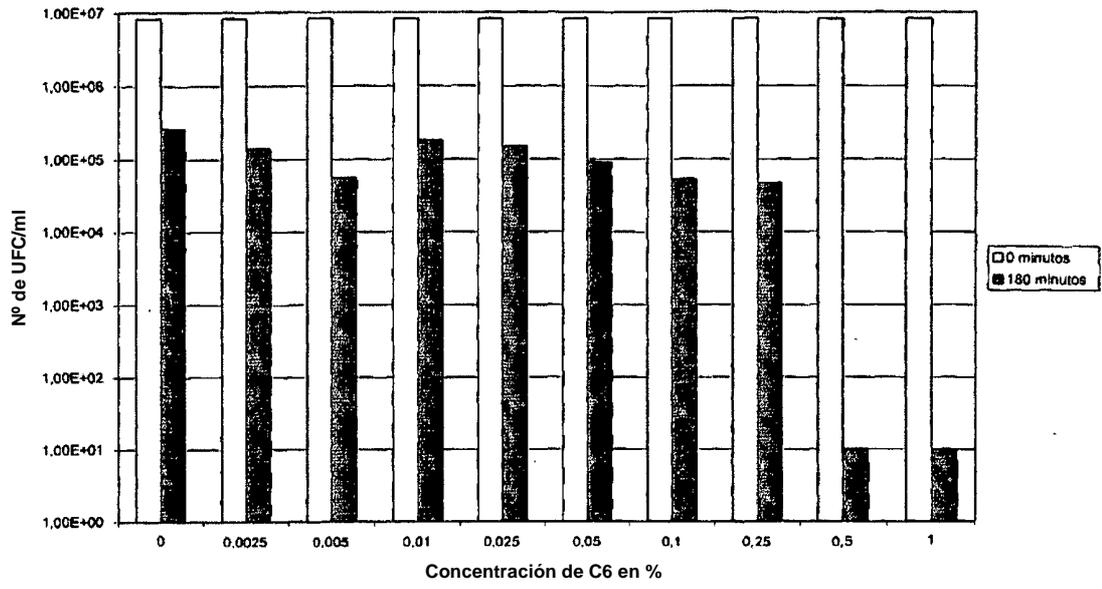


FIG. 9