

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 119**

51 Int. Cl.:

A23K 1/16 (2006.01)

A23K 1/18 (2006.01)

A61P 1/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2008** **E 08784531 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015** **EP 2187762**

54 Título: **Uso de sesquiterpenos como aditivos de piensos en alimentación animal**

30 Prioridad:

11.09.2007 EP 07017706

11.12.2007 EP 07023955

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

05.05.2015

73 Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)

HET OVERLOON 1

6411 TE HEERLEN, NL

72 Inventor/es:

FREHNER, MARCO;

LOSA, RICCARDO y

SCHUEPFER, PATRICK

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 535 119 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

Uso de sesquiterpenos como aditivos de piensos en alimentación animal.

La presente invención se refiere al uso de sesquiterpenos en la preparación de componentes de piensos animales o aditivos de piensos para uso en el alivio, la curación, o la prevención de enfermedades causadas por especies de *Clostridium*.

El término pienso o composición de pienso significa cualquier compuesto, preparación, mezcla, o composición adecuada para, o destinada a ser ingerida por un animal.

De modo más particular, la presente invención se refiere a una composición nutracéutica para animales que comprende como ingrediente activo al menos un sesquiterpeno, un derivado o metabolito del mismo con un LogP > 3, preferiblemente > 4, como se define por la reivindicación.

El término logP significa un coeficiente de reparto o coeficiente de distribución. El mismo es una medida de la solubilidad diferencial de un compuesto en los disolventes octanol y agua. El coeficiente de reparto octanol-agua es una medida del carácter hidrófobo y el carácter hidrófilo de una sustancia. Conforme a la presente invención, es la ratio logarítmica de las concentraciones del soluto en dichos disolventes. Existen muchos calculadores o predictores de LogP disponibles tanto comercialmente como de uso libre, por ejemplo de www.logp.com.

El término "nutracéutico", como se utiliza en esta memoria, denota utilidad en ambos campos de aplicación nutricional y farmacéutico. Así, las composiciones nutracéuticas pueden encontrar uso como pienso animal completo (dieta), como suplemento para el pienso animal (aditivo de piensos), y como formulaciones farmacéuticas para aplicación enteral o parenteral que pueden ser formulaciones sólidas o formulaciones líquidas.

Ejemplos de animales son no rumiantes y rumiantes. Los animales rumiantes incluyen, por ejemplo, animales tales como ovejas, cabras, y ganado vacuno, v.g. vacas tales como vacuno de engorde y vacas de leche. En una realización particular, el animal es un animal no rumiante. Animales no rumiantes incluyen animales domésticos, v.g., caballos, gatos y perros; animales monogástricos, v.g. cerdos o puercos (con inclusión, pero sin carácter limitante, de lechones, cerdos de engorde, y marranas); aves de corral tales como pavos, patos y pollos (con inclusión, pero sin carácter limitante, de pollos de asar y gallinas ponedoras); peces (con inclusión, pero sin carácter limitante, de salmón, trucha, tilapia, bagre y carpa); y crustáceos (con inclusión, pero sin carácter limitante, de camarones y gambas), terneros (rumiante joven sin rumen funcional o con rumen en desarrollo).

Los presentes inventores han encontrado ahora sorprendentemente que los sesquiterpenos con un logP > 3, preferiblemente > 4, tienen un gran potencial para uso en alimentación animal, v.g. para mejora de la ratio de conversión del pienso (FCR) y/o para modulación de la flora intestinal. Adicionalmente, se ha encontrado que una composición que comprende al menos un sesquiterpeno especificado anteriormente en esta memoria puede utilizarse para prevención de enfermedades causadas por *Clostridium sp*.

La presente invención proporciona el uso de sesquiterpenos como se definen en la reivindicación en la fabricación de piensos animales o aditivos de piensos animales para la prevención de enfermedades causadas por *Clostridium sp* - particularmente *Clostridium perfringens* - en animales, tales como aves de corral y mamíferos.

Por tanto, la presente invención se refiere al uso de dichos compuestos y de derivados de los mismos como componentes de piensos o aditivos de piensos animales.

La invención se refiere adicionalmente al uso de estos compuestos y derivados de los mismos para la preparación de composiciones que mejoran la eficiencia de los animales, teniendo especialmente actividad como moduladores de la microflora gastrointestinal y que son aplicables por la vía de la alimentación animal.

Por último, la presente invención se refiere a aditivos de piensos animales sobre la base de un compuesto sesquiterpeno conforme a la invención, un derivado o metabolito del mismo y piensos animales que contienen como aditivo un compuesto de este tipo, un derivado o metabolito del mismo.

Las enfermedades causadas por *Clostridium sp* son comunes en las poblaciones animales de aves de corral, cerdos, conejos, ratas y terneros. Existe, por ejemplo, un enlace entre la enfermedad enteritis necrótica y la presencia de *Clostridium perfringens*. La enteritis necrótica se caracteriza por inflamación severa y esfacelación de los tractos intestinales y ocurre a menudo junto con la coccidiosis.

Se ha descrito en muchos artículos la cantidad de *Clostridium perfringens* en los tractos digestivos tiene un impacto considerable en la salud y tasa de crecimiento de un pollo para asar. Síntomas típicos de las aves infectadas son: plumas erizadas, depresión apreciable, pérdida de apetito, excrementos blandos/líquidos o diarrea y una relucencia acusada a moverse. Ejemplos de tales artículos son B.S. Bains (1979) "A manual for poultry diseases" (Ed. Roche, Basilea, Suiza); B Köhler, K Vogel y P Starost (1979) "Nekrotisierende und Ulzerative Enteritis bei Hühnern der Mast- und Legerichtung unter Bedingungen industriemässiger Geflügelproduktion" (Mh. Vet.-Med., 32, 704-711); B Köhler, K Vogel, W Witte y H Kühn (1983) "Vergleich der Ursachen von Hospitalismus

- durch *Cl. perfringens*, *Staphylococcus aureus* und *Salmonellen* unter den Bedingungen der industriemässigen Geflügelproduktion und Möglichkeiten ihrer Bekämpfung", (V. Intern. Tierhyg. Symposium, 25 y 26.05.93, Leipzig, Sammelband der Vorträge, Veterinärmedizinische Fakultät Leipzig); Th. Vissienon, U Johannsen y B Köhler (1994) "Untersuchungen zur Pathologie und Pathogenese der *Clostridium perfringens*-Typ-A-Enterotoxämie des Huhnes. 1. Versuche zur experimentellen Erzeugung der Krankheit, Versuchsansatz, klinisches Bild und Morbiditätsraten", (Mh. Vet.-Med., 49, 23-28); Th. Vissienon, U Johannsen, M Solveig y B Köhler (1994) "Untersuchungen zur Pathologie und Pathogenese der *Clostridium perfringens*-Typ-A-Enterotoxämie des Huhnes. 2. Pathomorphologische und bakteriologische Befunde nach experimenteller intraduodenaler *Cl. perfringens*-Typ-A-Infektion" (Sporen und vegetative Keime) und Toxinapplikation (Mh. Vet.-Med., 49, 93-102).
- 10 Los terpenos están muy extendidos en la naturaleza, principalmente en plantas como constituyentes de los aceites esenciales. Su bloque de construcción es el hidrocarburo isopreno (C_5H_8). Los sesquiterpenos son una clase de terpenos que está constituida por tres unidades isopreno y tienen la fórmula molecular $C_{15}H_{24}$. Al igual que los monoterpenos, los sesquiterpenos pueden ser acíclicos o contener anillos, con inclusión de muchas combinaciones singulares. Modificaciones bioquímicas tales como oxidación o transposición producen los sesquiterpenoides afines.
- 15 El rasgo principal de los compuestos conforme a la invención es la ratio logP característica de al menos 3, preferiblemente de al menos 4.
- Los sesquiterpenos y sus derivados que pueden utilizarse conforme al principio de inventiva se clasifican como sigue:
- 20 Acíclicos: Biosintéticamente, cuando reacciona pirofosfato de geranilo con pirofosfato de isopentenilo, el resultado es el pirofosfato de 15 carbonos farnesilo, que es un compuesto intermedio en la biosíntesis de sesquiterpenos tales como farneseno. La oxidación puede proporcionar luego sesquiterpenoides tales como farnesol.
- Monocíclicos: Con el aumento de la longitud de cadena y el enlace doble adicional, aumenta también el número de posibles vías por las que puede ocurrir la ciclación y existe una gran diversidad de sesquiterpenos cíclicos. Además de los sistemas comunes de anillos de seis miembros tales como se encuentran en el zingibereno, un constituyente del aceite de jengibre, la ciclación de un extremo de la cadena con el otro extremo puede conducir a anillos macrocíclicos tales como humuleno.
- 25 Bicíclicos: Además de los anillos comunes de seis miembros tales como existen en los caninenos, un sesquiterpeno bicíclico clásico es el cariofileno del aceite de clavo, que tiene un anillo de nueve miembros y un anillo ciclobutano. La insaturación adicional proporciona sesquiterpenoides aromáticos bicíclicos tales como vetivazuleno y guayazuleno.
- 30 Tricíclicos: Con la adición de un tercer anillo, las estructuras posibles llegan a ser cada vez más diversas. Ejemplos incluyen longifoleno, copaeno y el alcohol patchulol.

Compuestos para uso conforme a la presente invención se dan a conocer en la Tabla 1.

- 35 Tabla 1

Sesquiterpeno	LogP
Farnesil-acetona	7,39
Acetato de farnesilo	7,16
40 Trans-trans farnesol	6,47
α -cedreno	6,46
α -cubebeno	6,43
α -copaeno	6,33
γ -humuleno	6,1
bisaboleno/farneseno	6,03
β -humuleno	6,02
(-) iso-ledeno	6,02
(+) ledeno	6
β -cedreno	5,76
Longifoleno	5,75
Aromadendreno	5,67
alo-aromadendreno	5,67
Acetato de cedrilo	5,15
Farnesal	4,98
α -bisabolol	4,82
Germacrona	4,71
Nerolidol	4,65
cedreno-9-ol	4,09
(-) globulol	3,52

(-) epiglobulol	3,52
Cedrol	3,46

Los compuestos conforme a la invención están disponibles comercialmente o pueden ser preparados fácilmente por una persona experta utilizando procesos y métodos bien conocidos en la técnica anterior. En particular, el sesquiterpeno puede aislarse y purificarse por métodos conocidos per se, v.g. a partir de aceite esencial de cúrcuma o aceite del árbol del té.

- 5 Los sesquiterpenos conforme a la invención y composiciones que los contienen mejoran el rendimiento de los animales, a saber el estado general de salud y su aumento de peso durante la crianza. Los compuestos especificados anteriormente en esta memoria pueden considerarse especialmente como moduladores de la microflora gastrointestinal de los animales, lo cual es importante para su estado de salud, con inclusión del aumento de peso. Los efectos positivos a este respecto pueden estar basados al menos parcialmente en sus efectos
- 10 inhibidores sobre microorganismos potencialmente patógenos, v.g. sobre la actividad antibacteriana. Por tanto, aquéllos pueden utilizarse como aditivos de piensos o para la preparación de los mismos y de piensos por mezcla o procesamiento de los mismos con piensos animales convencionales o componentes de los mismos para todas las clases de animales en cantidades que proporcionan la ingestión diaria requerida o deseada. Animales preferidos que pueden necesitar dichos aditivos comprenden mamíferos, v.g. rumiantes, cerdos, terneros, caballos, animales
- 15 domésticos, aves, v.g. aves de corral (pollos, gallinas, gansos, patos, pavos), peces y animales de parques zoológicos.

- Los sesquiterpenos o derivados de los mismos pueden ser administrados a los animales como componentes de una composición nutracéutica que se suministra convencionalmente a los animales como alimento. Así, los sesquiterpenos y derivados de los mismos pueden administrarse convenientemente a los animales como un
- 20 componente del pienso animal o en su agua de bebida. Dichos compuestos o derivados pueden administrarse también a los animales como componente de una composición farmacéutica.

- La dosis diaria normal de un compuesto conforme al uso de la invención proporcionada a un animal por ingestión del pienso depende de la clase de animal y su estado. Normalmente, esta dosis debería estar comprendida en el intervalo que va desde aproximadamente 0,05 a aproximadamente 10 mg, con preferencia desde aproximadamente
- 25 0,1 a aproximadamente 5 mg de compuesto por kg de pienso.

En una realización preferida de la invención, el sesquiterpeno o derivado del mismo que se utiliza en una cantidad suficiente para proporcionar una dosis diaria de 0,0125 mg por kg de peso corporal a aproximadamente 0,5 mg por kg de peso corporal del individuo al que va a administrarse.

- Los sesquiterpenos o derivados de los mismos pueden utilizarse en combinación con los ingredientes convencionales presentes en una composición de pienso animal (dieta) tales como carbonato de calcio, electrolitos tales como cloruro de amonio, proteínas tales como harina de soja, trigo, almidón, harina de girasol, maíz, harina de carne y de huesos, aminoácidos, grasa animal, vitaminas y minerales traza.
- 30

- En una realización particular, la invención se refiere a métodos para utilización de sesquiterpenos en el pienso animal para mejorar la Ratio de Conversión del Pienso (FCR) y/o para modulación de la microflora intestinal. En realizaciones alternativas, los sesquiterpenos conforme a la invención mejoran la digestibilidad del pienso animal, y/o mantienen el estado sanitario del animal por favorecer una digestión adecuada y/o respaldar la función del sistema
- 35 inmune.

- La FCR puede determinarse sobre la base de una prueba de crecimiento de pollos para asar que comprende un primer tratamiento en el que el sesquiterpeno conforme a la invención se añade a la alimentación animal en una concentración adecuada por kg de pienso, y un segundo tratamiento (control) sin adición alguna del sesquiterpeno a la alimentación animal.
- 40

Como se conoce en general, una FCR mejorada es menor que la FCR de control. En realizaciones particulares, la FCR está mejorada (es decir, reducida) en comparación con el control al menos en 1,0%, preferiblemente al menos 1,5%, 1,6%, 1,7%, 1,8%, 1,9%, 2,0%, 2,1%, 2,2%, 2,3%, 2,4%, o al menos 2,5%.

- El término "intestino", como se utiliza en esta memoria, designa el tracto gastrointestinal o digestivo (al que se hace referencia también como el canal alimentario) y se refiere al sistema de órganos en los animales multicelulares que ingiere el alimento, lo digiere para extraer energía y nutrientes, y expulsa el residuo remanente.
- 45

- El término "microflora" intestinal, como se utiliza en esta memoria, se refiere a los cultivos microbianos naturales residentes en el intestino y que mantienen la salud por ayudar a una digestión apropiada y/o respaldar la función del sistema inmunitario.
- 50

El término "modular", como se utiliza en esta memoria en conexión con la microflora intestinal, significa generalmente cambiar, manipular, alterar, o ajustar la función o estado de la misma en un animal sano y normalmente funcional, es decir, un uso no terapéutico.

Ejemplos particulares de composiciones relacionadas con la invención son los siguientes:

- un aditivo de piensos animales que comprende (a) al menos un sesquiterpeno, o un derivado del mismo como se especifica anteriormente en esta memoria, (b) al menos una vitamina liposoluble, (c) al menos una vitamina hidrosoluble, (d) al menos un mineral traza, y/o (e) al menos un macro-mineral;
- 5 - una composición de pienso animal que comprende al menos un sesquiterpeno o un derivado del mismo conforme a la invención y un contenido de proteína bruta de 50 a 800 g/kg de pienso.

Las denominadas premezclas son ejemplos de aditivos de piensos animales relacionados con la invención. Una premezcla designa una mezcla preferiblemente uniforme de uno o más micro-ingredientes con diluyente y/o portador. Las premezclas se utilizan para facilitar la dispersión uniforme de los micro-ingredientes en una mezcla mayor.

Para uso en alimentación animal, sin embargo, el al menos un sesquiterpeno no precisa ser puro; la composición correspondiente puede incluir otros sesquiterpenos y derivados o el al menos un sesquiterpeno puede estar comprendido entre los 5 o 10 componentes principales de un extracto que se utiliza en piensos animales.

En el presente contexto, el término Ratio de Conversión del Pienso, o FCR, se utiliza como sinónimo del término conversión de pienso. La FCR se calcula como la ingestión de pienso en g/animal referida al aumento de peso en g/animal.

Adicionalmente, ingredientes opcionales aditivos de piensos son agentes colorantes, v.g. carotenoides tales como beta-caroteno, cantaxantina, apoéster, astaxantina, y luteína; compuestos de aromas; estabilizadores; péptidos antimicrobianos; ácidos grasos poliinsaturados; especies generadoras de oxígeno reactivo; y/o al menos una enzima seleccionada de entre fitasa (EC 3.1.3.8 o 3.1.3.26); xylanasa (EC 3.2.1.8); galactanasa (EC 3.2.1.89); alfa-galactosidasa (EC 3.2.1.22); proteasa (EC 3.4.), fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32); fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4); lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5); fosfolipasa C (EC 3.1.4.3); fosfolipasa D (EC 3.1.4.4); amilasa tal como, por ejemplo, alfa-amilasa (EC 3.2.1.1); y/o beta-glucanasa (EC 3.2.1.4 o EC 3.2.1.6).

Ejemplos de ácidos grasos poliinsaturados son ácidos grasos poliinsaturados C18, C20 y C22, tales como ácido araquidónico, ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico y ácido gamma-linoleico.

Ejemplos de especies generadoras de oxígeno reactivo son productos químicos tales como perborato, persulfato, o percarbonato; y enzimas tales como una oxidasa, una oxigenasa o una sintetasa.

Usualmente, las vitaminas lipo- e hidrosolubles, así como minerales traza forman parte de una denominada premezcla destinada a adición al pienso, mientras que los macro-minerales se añaden usualmente al pienso por separado. Cualquiera de estos tipos de composición, cuando está enriquecido con sesquiterpeno, es un aditivo de piensos animales relacionado con el uso de la invención.

Las siguientes son listas no excluyentes de ejemplos de estos componentes.

Ejemplos de vitaminas liposolubles son vitamina A, vitamina D3, vitamina E, y vitamina K, v.g., vitamina K3.

Ejemplos de vitaminas hidrosolubles son vitamina C, vitamina B12, biotina y colina, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, niacina, ácido fólico y pantotenato, v.g., D-pantotenato de calcio.

Ejemplos de minerales traza son manganeso, cinc, hierro, cobre, yodo, selenio, y cobalto.

Ejemplos de macro-minerales son calcio, fósforo y sodio.

Los requerimientos nutricionales de estos compuestos (ilustrados con aves de corral y lechones/cerdos) se enumeran en la Tabla A de WO 01/58275. El requerimiento nutricional significa que estos componentes deberían proporcionarse en la dieta en las concentraciones indicadas.

En la alternativa, el aditivo de piensos animales de la invención comprende al menos uno de los componentes individuales especificados en la Tabla A de WO 01/58275. Al menos uno significa cualquiera de, uno o más de, uno, o dos, o tres, o cuatro, etcétera hasta la totalidad de trece, o hasta la totalidad de quince componentes individuales. Más específicamente, éste al menos un componente individual está incluido en el aditivo de la invención en tal cantidad que proporcione una concentración en el pienso dentro del intervalo indicado en la columna cuatro, o la columna cinco, o la columna seis de la Tabla A.

Las composiciones de piensos o dietas animales tienen un contenido relativamente alto de proteína. Las dietas para aves de corral y cerdos pueden caracterizarse como se indica en la Tabla B de WO 01/58275, columnas 2-3. Las dietas para peces pueden caracterizarse como se indica en la columna 4 de esta Tabla B. Adicionalmente, tales dietas para peces tienen usualmente un contenido bruto de grasa de 200-310 g/kg.

WO 01/58275 corresponde a US 09/779334.

Una composición de pienso animal conforme al uso de la invención tiene un contenido bruto de proteína de 50-800 g/kg, y comprende adicionalmente al menos un sesquiterpeno y/o al menos un derivado del mismo como se describe y/o se reivindica en esta memoria.

- 5 Adicionalmente, o en la alternativa (para el contenido de proteína bruta arriba indicado), la composición de pienso animal tiene un contenido de energía metabolizable de 10-30 MJ/kg; y/o un contenido de calcio de 0,1-200 g/kg; y/o un contenido de fósforo disponible de 0,1-200 g/kg; y/o un contenido de metionina de 0,1-100 g/kg; y/o un contenido de metionina más cisteína de 0,1-150 g/kg; y/o un contenido de lisina de 0,5-50 g/kg.

- 10 En realizaciones particulares, el contenido de energía metabolizable, proteína bruta, calcio, fósforo, metionina, metionina más cisteína, y/o lisina está dentro de uno cualquiera de los intervalos 2, 3, 4 ó 5 en la Tabla B de WO 01/58275 (R. 2-5).

La proteína bruta se calcula como nitrógeno (N) multiplicado por un factor 6,25, es decir proteína bruta (g/kg) = N (g/kg) x 6,25. El contenido de nitrógeno se determina por el método Kjeldahl ((A.O.A.C., 1984, Official Methods of Analysis 14th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington DC).

- 15 La energía metabolizable puede calcularse sobre la base de la publicación NRC Nutrient requirements in swine, novena edición revisada 1988, subcomité sobre nutrición de cerdos, comité sobre nutrición animal, oficina de agricultura, junta de investigación nacional. National Academy Press, Washington, D.C., pp. 2-6, y la Tabla Europea de Valores de Energía para Piensos de Aves de Corral, centro Spelderholt para investigación y extensión de las aves de corral, 7361 DA Beekbergen, Países Bajos. Grafisch bedrijf Ponsen & Iooijen bv, Wageningen. ISBN 90-71463-12-5.

El contenido en la dieta de calcio, fósforo disponible y aminoácidos en las dietas animales completas se calcula sobre la base de tablas de alimentación tales como Veevoedertabel 1997, gegevens over chemische samenstelling, verteerbaarheid en voederwaarde van voedermiddelen, Central Veevoederbureau, Runderweg 6, 8219 pk Lelystad. ISBN 90-72839-13-7.

- 25 En una realización particular, la composición de pienso animal con relación al uso de la invención contiene al menos una proteína o fuente de proteína vegetal. La misma puede contener también proteína animal, tal como harina de carne y de huesos, y/o harina de pescado, típicamente en una cantidad de 0-25%. El término proteínas vegetales, como se utiliza en esta memoria, se refiere a cualquier compuesto, composición, preparación o mezcla que incluye al menos una proteína derivada de o procedente de un vegetal, con inclusión de proteínas y derivados de proteínas modificados. En realizaciones particulares, el contenido de proteína de las proteínas vegetales es al menos 10, 20, 30, 40, 50 ó 60% (p/p).

Las proteínas vegetales pueden derivarse de fuentes proteínicas de vegetales, tales como legumbres y cereales, por ejemplo materiales de plantas de las familias Fabáceas (Leguminosas), Crucíferas, Quenopodiáceas, y Poáceas, tales como harina de soja, harina de altramuz y harina de colza.

- 35 En una realización particular, la fuente de proteínas vegetales es un material de una o más plantas de la familia Fabáceas, v.g., soja, altramuz, guisante, o haba.

En otra realización particular, la fuente de proteína vegetal es un material de una o más plantas de la familia Quenopodiáceas, v.g., remolacha común, remolacha azucarera, espinaca o quinoa.

Otros ejemplos de fuentes de proteína vegetal son colza, semilla de girasol, semilla de algodón, y col.

- 40 Otros ejemplos de fuentes de proteína vegetal son cereales tales como cebada, trigo, centeno, avena, maíz dulce (maíz común), arroz, trigo híbrido, y sorgo.

En otras realizaciones particulares adicionales, la composición de pienso animal contiene 0-80% maíz; y/o 0-80% sorgo, y/o 0-70% trigo, y/o 0-70% cebada; y/o 0-30% avena; y/o 0-30% centeno; y/o 0-40% harina de soja; y/o 0-25% harinas de pescado y/o 0-25% harina de carne y de huesos; y/o 0-20% de lactosuero.

- 45 Las dietas animales pueden fabricarse v.g. como pienso en puré (no granulado) o pienso granulado. Típicamente, los piensos molidos se mezclan y se añaden cantidades suficientes de vitaminas esenciales y minerales conforme a las especificaciones para la especie de que se trate. El sesquiterpeno o el derivado del mismo pueden añadirse como formulaciones sólidas o líquidas.

- 50 La concentración final de sesquiterpeno ["final" debe considerarse como el "total" o la "suma de todos los sesquiterpenos"] en la dieta está comprendida dentro del intervalo de 0,05-200 mg por kg de dieta, por ejemplo en el intervalo de 0,2-10 mg por kg de dieta animal.

El sesquiterpeno o el derivado del mismo debería aplicarse por supuesto en una cantidad eficaz, v.g. en una cantidad adecuada para mejora de la conversión del pienso.

En la actualidad se contempla que el sesquiterpeno se administre en una o más de las cantidades siguientes (intervalos de dosificación): 0,01-500; 0,01-200; 0,01-100; 0,02-50, 0,05-20 0,5-100; 1-50; 5-100; 10-100; 0,05-50; 1-10; o 0,10-10, expresándose todas estas cantidades en mg de sesquiterpeno por kg de pienso (ppm).

Los ejemplos siguientes ilustran adicionalmente la invención, pero no deberían interpretarse como limitantes de la misma.

Ejemplo 1: Aditivo de Pienso Animal

Se prepara un aditivo de pienso animal por adición de 1 g de al menos uno de un sesquiterpeno seleccionado de la Tabla 1 a la premezcla siguiente (por kilo de premezcla):

10	1100000 IE	vitamina A
	300000 IE	Vitamina D3
	4000 IE	Vitamina E
	250 mg	Vitamina B1
15	800 mg	Vitamina B2
	1200 mg	D-Pantotenato de Ca
	500 mg	Vitamina B6
	2,5 mg	Vitamina B12
	5000 mg	Niacina
20	10000 mg	Vitamina C
	300 mg	Vitamina K3
	15 mg	Biotina
	150 mg	Ácido fólico
	50004 mg	Cloruro de colina
25	6000 mg	Fe
	3000 mg	Cu
	5400 mg	Zn
	8000 mg	Mn
	124 mg	I
30	60 mg	Co
	29,7 mg	Se
	9000 mg	Lasalocid Sodio (Avatec)
	17,3 %	Ca
	0,8 %	Mg
35	11,7 %	Na

Ejemplo 2: Pienso Animal

Se prepara una dieta de crecimiento para pollos de asar que tiene la composición siguiente (% , p/p) por mezcla de los ingredientes. Trigo, centeno, y SBM 48 están disponibles de Moulin Moderne Hirsingue, Hirsingue, Francia. Después de la mezcladura, el pienso se somete a granulación a una temperatura deseada, v.g. aproximadamente 70°C (3 x 25 mm).

Trigo	46,00
Centeno	15,00
Soy Bean Meal (SBM 48)	30,73
Harina de soja	4,90
DL-Metionina	0,04
DCP (Fosfato dicálcico)	1,65
Caliza	0,43
Sal	0,15
TiO2	0,10
Aditivo de pienso animal (anterior)	0,50

El pienso animal resultante comprende 5 mg de sesquiterpeno por kg (5 ppm).

Ejemplo 3:

Puede prepararse un pienso para pollos de asar ("de iniciación") que contiene al menos uno de un sesquiterpeno seleccionado de la Tabla 1, mezclando entre sí los siguientes ingredientes con empleo de un aparato de mezcladura convencional a la temperatura ambiente.

<u>Ingrediente</u>	<u>Cantidad (kg)</u>
Harina de soja	34,50
Maíz dulce	20,00
Trigo	37,80
Aceite de soja	3,13
Minerales	2,90
Premezcla de aminoácidos sintéticos	0,17
Premezcla de vitaminas y elementos traza	1,00
Premezcla de sesquiterpenos (1,0% en almidón de trigo)	0,10

- 5 En principio, la premezcla de sesquiterpenos puede contener 0,1-2% del derivado de sesquiterpeno.

Ejemplo 4:

Puede prepararse un pienso para pollos de asar ("de crecimiento") que contiene al menos uno de un sesquiterpeno seleccionado de la Tabla 1 mezclando entre sí los siguientes ingredientes con empleo de un aparato de mezcladura convencional a la temperatura ambiente.

<u>Ingredientes</u>	<u>Cantidad (kg)</u>
Harina de soja	31,2
Maíz dulce	20,0
Trigo	41,3
Aceite de soja	3,4
Minerales	2,5
Premezcla de aminoácidos sintéticos	0,1
Premezcla de vitaminas y elementos traza	1,0
Premezcla de sesquiterpenos (1,% en almidón de trigo)	0,1

10

En principio, la premezcla de sesquiterpeno puede contener 0,1-2% del derivado de sesquiterpeno.

Ejemplo 5: La actividad antimicrobiana de los sesquiterpenos de la invención frente a *Clostridium perfringens*

- 15 La actividad antimicrobiana de los compuestos de la invención frente a *Clostridium perfringens* se determinó de la manera siguiente.

Se añadió *Clostridium perfringens* ATCC13124 (aprox. 10^6 cfu) a tubos de cultivo que contenían cantidades

- 20 diferentes de los sesquiterpenos descritos en la Tabla 1 en un total de 6 ml de un caldo de cultivo adecuado, y se dejaron incubar los cultivos con agitación a 37°C. A intervalos regulares durante la incubación, se tomaron lecturas de absorbancia (650 nm) para construir curvas de crecimiento. Las curvas de crecimiento de los cultivos de la invención se compararon también con las curvas de crecimiento de los controles por comparación visual. Donde el caldo de cultivo se mantenía claro y por consiguiente la curva plana, ello indicaba ausencia de crecimiento. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

A partir de los resultados es evidente que los sesquiterpenos de la invención tienen un efecto bacteriostático o al menos un efecto retardador del crecimiento in vitro sobre *Clostridium perfringens*.

25

Tabla 2

Sesquiterpeno/ ppm	100	30	10	6	2	1,2	1	0,5	0,4	0,3	0,2
farnesil-acetona			-		-						
acetato de farnesilo			-		-						
trans-trans farnesol			-		+						
α -cedreno			-		-	-				+/-	
α -cubebeno	-					-					+/-
α -copaeno	-					-		+			
β -cariofileno *	-				-		-	+/-	+/-		+
γ -humuleno						+/-			+		
bisaboleno/farneseno			-		-	-			+/-	+	
β -humuleno						-			+		
(-) iso-ledeno	-							+			
(+) ledeno	-				-	-					
α -humuleno (α -cariofileno) *			-		-	-			+	+	
β -cedreno			-		-	-				+/-	
Longifoleno			-		-	-				+	
Aromadendreno	-							+			
alo-aromadendreno	-				-						
Acetato de cedrilo				-	-						
Farnesal			+/-		+						
α -bisabolol			+/-		+						
Germacrona	-	-		+				+			
Nerolidol			-		+						
cedreno-9-ol			+		+						
(-) globulol	-		-		+			+			
(-) epiglobulol	-		-		+			+			
Cedrol			-		+						

El símbolo "-" indica ausencia de crecimiento o, en la comparación, crecimiento claramente más lento que el cultivo de control del organismo de test, mientras que "+" indica crecimiento, o, en la comparación, crecimiento similar al del control.

* No de acuerdo con la invención.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un sesquiterpeno en la fabricación de un componente de pienso o aditivo de pienso animal para uso en la prevención de enfermedades causadas por *Clostridium sp*, en donde el sesquiterpeno se selecciona del grupo constituido por farnesil-acetona, acetato de farnesilo, farnesol trans-trans, α -cedreno, α -cubebeno, α -copaeno, γ -humuleno, bisaboleno/farneseno, β -humuleno, (-)iso-ledeno, (+)ledeno, β -cedreno, longifoleno, aromadendreno, aloaromadendreno, acetato de cedrilo, farnesal, α -bisabolol, germacrona, nerolidol, cedreno-9-ol, (-)globulol, (-)epiglobulol, y cedrol.
- 5