

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 508**

51 Int. Cl.:

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: **27.09.2011** **E 11761084 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015** **EP 2627194**

54 Título: **Uso de ácido benzoico o una sal del mismo para reducir trastornos del tracto urinario en rumiantes**

30 Prioridad:

13.10.2010 EP 10187372

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

11.09.2015

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:

**BEGOS, ELISE y
BROZ, JIRI**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 545 508 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 ácido benzoico o una sal del mismo para reducir trastornos del tracto urinario en rumiantes

5 La presente invención se refiere al uso de ácido benzoico, o una sal del mismo en rumiantes para la prevención y el tratamiento de la urolitiasis, para la reducción del número y/o tamaño de urolitos en la orina, para aumentar la densidad de la orina, para aumentar la cantidad de orina excretado sin cambiar el volumen de agua ingerida y/o para mejorar el bienestar del animal.

Además, la invención se refiere a un método para reducir el número y/o tamaño de los urolitos en la orina de rumiantes.

10 La urolitiasis es la formación de cálculos (urolitos) en el tracto urinario. Los urolitos se producen en ambos sexos, pero la urolitiasis obstructiva se desarrolla principalmente en los hombres debido a las diferencias anatómicas. Se observa con mayor frecuencia en ovejas y cabras castradas. Animales castrados a una edad temprana son particularmente propensos a problemas con urolitos, ya que el proceso elimina la hormona responsable de la formación del pene y de la uretra en adultos.

15 Mientras que los urolitos se producen a lo largo del tracto urinario, los alojados en la uretra (uretrolitos) son los que provocan la mayoría de los problemas en cabras y ovejas. Los uretrolitos puede impedir el paso de la orina provocando dolores a los animales y la posible ruptura de la vejiga y conduciendo a la muerte del animal.

20 La causa principal de la formación de urolitos es un desequilibrio dietético. El tipo de las formas de los cálculos depende del tipo de desequilibrio. Dietas ricas en granos y pobres en fibra tienden a tener bajas relaciones de calcio/fosfato o a ser ricas en magnesio. Tales dietas conducen a la formación de cálculos de estruvita (fosfato de magnesio y amonio). Animales que pastan en suelos ricos en sílice pueden formar urolitos de sílice. Dietas ricas en calcio (por ejemplo, contienen trébol subterráneo) pueden dar lugar a la formación de urolitos de carbonato de calcio. La formación de urolitos de oxalato de calcio se ha asociado con la alimentación de animales de las partes apicales de la remolacha azucarera. Otros factores que influyen en la formación de cálculos incluyen la falta de agua potable y el agua que es rica en minerales. Si un animal de un rebaño desarrolla la condición, todos los animales del rebaño
25 están en riesgo. La urolitiasis es más frecuente en los meses de invierno.

30 Los signos observados en animales con urolitiasis incluyen sangre en la orina, esfuerzo y dolor en la micción, goteo de la desazón de orina, pisoteo de las patas, chasquido de la cola, rechinar de dientes, dolor abdominal y las cabras pueden vocalizar su dolor. Los animales con obstrucción de la uretra exhiben síntomas de cólico tal como pataleo de las patas traseras y movimientos circulares de la cola combinado con una pérdida del apetito. El dolor asociado con la urolitiasis puede requerir la administración de alivio del dolor para el animal.

35 Es bien conocido en la técnica que se puede reducir la incidencia de urolitos en corderos suplementando el pienso con cloruro de amonio al menos al 1%. Sin embargo, el cloruro de amonio no puede utilizarse más como una estrategia de prevención de la urolitiasis en el pienso para rumiantes, ya que ha sido re-clasificado como un fármaco veterinario en Europa. Además, (Bushman *et al.* 1967 J. Anim. Sci. 26: 1205-1204) han demostrado que un nivel eficaz de cloruro de amonio (1,5% en peso de la ración total de alimentos), además de reducir el número de urolitos, también disminuía la ganancia de peso del animal a causa de la disminución de la palatabilidad. Además de ello, cloruro excretado en la orina representa una creciente preocupación por la contaminación del medio ambiente con productos químicos. Por lo tanto, cloruro de amonio sólo se utiliza como un tratamiento veterinario que tiene un impacto negativo en el rendimiento general del animal.

40 Stewart et al. (1991: J. Anim. Sci. 69: 2225-2229) han demostrado también que era necesaria una acidificación de al menos 0,82 unidades de pH para reducir significativamente la incidencia de urolitos en corderos alimentados con cloruro de amonio.

45 El documento EP 0 683 985 describe una composición de alimentos para animales que comprende ácido benzoico o una sal del mismo y una sal de amonio de un ácido carboxílico para reducir el valor de pH de los excrementos por debajo de 7, reduciendo con ello las emisiones de amoníaco. Esta aplicación se ha limitado hasta ahora a los cerdos, ya que la persona experta en la técnica espera que el ácido benzoico sea metabolizado fácilmente por el ecosistema complejo (rumen) del rumiante.

El documento US 5603945 describe un producto alimenticio que comprende ácido fumárico para uso en el tratamiento de la calculosis urinaria, o urolitiasis en gatos y perros.

5 El objetivo de la presente invención era encontrar un aditivo para piensos fácilmente utilizable (autorizado por las autoridades de seguridad de los alimentos y piensos) en rumiantes y que sea capaz de prevenir la formación y/o el tratamiento de urolitos en la orina de los rumiantes, resolviendo con ello un problema clave del bienestar animal.

10 Los autores de la presente solicitud encontraron ahora, sorprendentemente, que el ácido benzoico se puede utilizar de manera eficaz para reducir el número y/o tamaño de los urolitos que se desarrollan en la orina de rumiantes alimentados con una dieta que aumenta el riesgo de la urolitiasis. En contraposición a las soluciones de la técnica anterior, se sabe que el ácido benzoico es seguro para el animal, y no perjudicial para el medio ambiente, ya que se utiliza ampliamente como un conservante de alimentos.

No era previsible por parte de la persona experta en la técnica que la adición de ácido benzoico al pienso para rumiantes desencadenara una fuerte reducción en el número y/o tamaño de los urolitos, debido a que el efecto en la acidificación de orina es bastante moderada en rumiantes (aproximadamente 0,2 unidades de pH).

15 Por lo tanto, la presente invención proporciona un concentrado de pienso que comprende ácido benzoico, o una sal del mismo para su uso en el tratamiento y/o prevención de la urolitiasis en rumiantes.

El término "urolitiasis" significa una enfermedad conocida en ovejas que se caracteriza por el desarrollo de cálculos en el tracto urinario. Esta enfermedad se encuentra a menudo en pequeños rumiantes, con una mayor incidencia en los machos castrados. A menudo es el resultado de un desequilibrio en fósforo/calcio que resulta en un régimen de alimentación rico en concentrado.

20 La expresión "concentrado para pienso" significa un preparado utilizado en la nutrición de rumiantes para proporcionar los nutrientes que el pienso por sí solo no puede proporcionar. Esto es particularmente cierto en el caso de animales de alta producción. También hay momentos y situaciones en los que los concentrados son una fuente más económica de nutrientes. Hay dos tipos de alimentos concentrados: carbonáceos y proteícos. Concentrados carbonáceos o alimentos "energéticos" tienden a ser bajos en proteínas (8-11%) Estos incluyen los cereales maíz, cebada, trigo, avena, sorgo y centeno. Concentrados proteícos o "suplementos proteícos" contienen altos niveles de proteínas (> 15%) y pueden ser de origen animal o vegetal. Incluyen harina de soja, harina de semilla de algodón y harina de pescado.

Ácidos benzoicos y/o sus sales pueden adquirirse de Sigma Chemicals. Una sal preferida de acuerdo con la presente invención se selecciona del grupo de sodio (Na), potasio (K) y calcio (Ca).

30 Todavía en otra realización, el rumiante se selecciona entre el grupo de ganado, ovejas y cabras, animales preferidos son ovejas y cabras, y más preferidas son ovejas y cabras macho castradas.

El concentrado para pienso de acuerdo con la presente invención contiene ácido benzoico o su sal, en donde la concentración total de ácido benzoico en el concentrado representa 0,1 a 2% en peso de la ración diaria total. En una realización preferida la concentración representa 0,5 a 1% en peso de la ración diaria total.

35 El concentrado para pienso de acuerdo con la presente invención se utiliza para reducir el número y/o tamaño de los urolitos en la orina, y/o para aumentar la cantidad de orina excretada sin cambiar el volumen de agua ingerida, y/o para aumentar la densidad de la orina.

40 El concentrado para pienso de acuerdo con la presente invención se utiliza para reducir el número de urolitos en la orina en al menos un 20% y para reducir el tamaño medio de los urolitos en la orina en al menos un 20% en comparación con los animales no suplementados. Los urolitos pueden ser fácilmente visualizados por microscopía óptica. El tamaño y número de urolitos se pueden medir fácilmente utilizando un hemocitómetro.

Preferiblemente, el concentrado para pienso de acuerdo con la presente invención se utiliza para aumentar la cantidad de orina excretada sin cambiar el volumen de agua ingerida. El volumen de orina se puede medir fácilmente en una jaula metabólica.

45 Más preferiblemente, el concentrado para pienso de acuerdo con la presente invención se utiliza para aumentar la densidad de la orina. Preferiblemente, la densidad de la orina se incrementa en 3 a 25%. La densidad de la orina se

define como su masa por unidad de volumen. En ovejas la densidad media de la orina está entre 1,015 y 1.045 cuando se mide por cistocentesis. Una densidad de la orina más alta significa una mayor capacidad del riñón de concentrar la orina.

5 El bienestar del animal es una preocupación creciente en la agricultura industrial. Síntomas de urolitiasis incluyen la presencia de sangre en la orina, esfuerzo y dolor en la micción, goteo de la desazón de orina, pisoteo de las patas, chasquido de la cola, rechinar de dientes, dolor abdominal y las cabras pueden vocalizar su dolor. Por lo tanto, en otra realización, el concentrado para pienso de acuerdo con la presente invención se utiliza para mejorar el bienestar animal, lo que significa mejorar el bienestar animal lo cual puede ser evaluado por los parámetros de comportamiento arriba mencionados.

10 A pesar de las enseñanzas adversas de la técnica anterior arriba revisada, la presente invención demuestra que mediante el uso de un ácido orgánico en la dieta de un rumiante, en una cantidad tal que el pH de la orina no se reduce significativamente, se puede observar el efecto beneficioso de reducir el tamaño y/o número de los urolitos, así como de mejorar el bienestar animal.

Preferiblemente, el rumiante para el método anterior se selecciona del grupo que consiste en ovejas y cabras.

15 La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Concentrados para pienso para ovejas que contienen ácido benzoico

Pienso	Pienso 1	Pienso 2	Pienso 3
	%	%	%
Trigo	4,00	4,00	4,00
Cebada	25,00	25,00	25,00
Salvado fino	25,00	25,00	25,00
Torta de soja 48	1,30	1,30	1,30
Torta de colza sin grasa	8,00	8,00	8,00
Pulpa de remolacha	18,00	18,00	18,00
Lucerne 17	16,00	15,50	14,50
Carbonato de calcio	0,70	0,70	0,70
Sal	0,50	0,50	0,50
Premezcla de aditivos para corderas	1,00	1,00	1,00
Vevovitall	0,50	1,00	2,00

20 **Ejemplo 2: Efecto del ácido benzoico alimentado a través del concentrado a ovejas castradas.**

1. Materiales y métodos

1.1 Animales

Se utilizaron en este estudio ocho ovejas Vendeen adultas castradas.

1.2 Alojamiento

25 En el período de medición, las ovejas fueron encerradas en jaulas individuales de evaluación, en un piso de rejilla de plástico. Cada una de las jaulas está provista de una canaleta de alimentación, un abrevadero, una bandeja de excrementos y un embudo de orina.

Fuera de los períodos de medición, las ovejas se dispusieron en jaulas individuales en el suelo sobre un lecho de virutas (no asegurado).

30

ES 2 545 508 T3

1.3 Raciones

Los animales fueron alimentados con 2 comidas iguales a las 9:00 y 17:00. El pienso granulado completo está racionado y se administra como una función del peso vivo del animal al inicio del período, de manera que el animal es alimentado en el mantenimiento de acuerdo con las recomendaciones del INRA (40 g DM/kg P^{0,75}; INRA 1988) (DM = materia seca).

5 Los datos para el pienso de concentrado formulada son los siguientes:

- 0,83 MFU, 92 g de IDP (MFU = Unidad de Forraje de Leche; IDP = Proteína Digestible Intestinal)
- 14% de TNM, 13% de celulosa bruta (TNM = Materia Nitrogenada Total)
- 4,6 g/kg de P
- 12,6 g/kg de Ca

10 Para los fines del ensayo, el pienso de control se formuló para que presentara un riesgo de fósforo (Ca/P = 2,7) y un equilibrio catión-anión elevado, es decir, 90,4 mEq/kg de DM. Los piensos fueron fabricados en la unidad experimental INZO en forma de gránulos de 8 mm. La composición se expone en detalle en la Tabla 1 y la Tabla 2.

El ácido benzoico era de DSM Nutritional Products en forma de Vevovitall.

La composición de los piensos se describe en las Tablas 1 y 2.

15 **Tabla 1: Composición de los piensos**

Pienso	Control	VEOVITALL 0.5	VEOVITALL 1
Código de pienso	3042	3043	3044
	%	%	%
Trigo	4,00	4,00	4,00
Cebada	25,00	25,00	25,00
Salvado fino	25,00	25,00	25,00
Torta de soja 48	1,30	1,30	1,30
Torta de colza sin grasa	8,00	8,00	8,00
Pulpa de remolacha	18,00	18,00	18,00
Lucerne 17	16,50	16,00	15,50
Carbonato de calcio	0,70	0,70	0,70
Sal	0,50	0,50	0,50
Premezcla de aditivos para corderas	1,00	1,00	1,00
Vevovitall		0,50	1,00

Tabla 2: Análisis químicos de los piensos

	3042	3043	3044
	CONTROL	VEOVITALL 0.5	VEOVITALL 1
Humedad en % DM	12,42	13,05	12,68
Minerales	7,30	7,59	7,66
Proteínas	15,81	15,76	16,32
Celulosa	13,66	13,12	13,11
Calcio	1,29	1,33	1,34
Fósforo	0,56	0,57	0,57
Cloruros	0,73	0,78	0,74
Sodio	0,32	0,33	0,33
Potasio	1,16	1,15	1,17

1.4 Esquema experimental

El ensayo se realiza en dos períodos (P1 y P2). Está precedido por un día de medición en la jaula (designado DO) justo antes del inicio del período de adaptación a la dieta de control (P1) y es seguido por un período post-experimental (P3).

5 Primer período (P1): a todos los animales se les da el pienso de control. Esta parte discurre a lo largo de 3 semanas y se compone de 1 tratamiento.

Tabla 3: Periodo experimental P1:

Días	1 a 12	13 a 19
Pienso	Pienso control	
Alojamiento de los animales	En el suelo	En jaulas

Segundo período: A los animales se les da el pienso control (2 animales) o uno de los dos piensos experimentales (2 X 3 animales). Este período se compone de 4 semanas y consiste en 3 tratamientos.

Tabla 4: Periodo experimental P2:

Días	1 a 19	20 a 26
Pienso	Pienso control o experimental	
Alojamiento de los animales	En el suelo	En jaulas

10

Tercer período: A los animales se les da el pienso control. Este período se compone de 2 semanas y consiste en 1 tratamiento.

Tabla 5: Periodo experimental P3:

Días	1 a 5	6 a 12
Pienso	Pienso control	
Alojamiento de los animales	En el suelo	En jaulas

Tabla 6: Asignaciones de animales (por sorteo):

	Animal A	Animal B	Animal C	Animal D	Animal E	Animal F	Animal G	Animal H
Identificación	10	104	119	51	67	60	88	73
Periodo 1	3042	3042	3042	3042	3042	3042	3042	3042
Periodo 2	3044	3043	3042	3042	3043	3044	3043	3044
Periodo 3	3042	3042	3042	3044	3042	3042	3042	3042

15 1.5 Mediciones y muestras

1.51 Pesaje de los animales:

Los animales se pesaron en el primer día de cada uno de los períodos (P1, P2 y P3).

Mediciones en DO y P3

20 La medición en DO está diseñada para verificar la coherencia de los parámetros urinarios entre las ovejas, en particular, su predisposición o no a microcristales. El Período 3 permite la persistencia del tratamiento a medir (después de paralizar una semana el tratamiento). Las mediciones tienen lugar a lo largo de una semana para P3, que corresponde a 5 días de mediciones. Los animales se disponen en jaulas un viernes (D6) y se retiran el viernes siguiente (D12). La medición en DO es una sola medición.

1.52 Las cantidades de agua bebida se calculan por día y por oveja.

25 1.53 Orina:

Inmediatamente después de la distribución de las dietas de la mañana, las bandejas llenas de orina son reemplazadas por las bandejas vacías limpias.

La orina se pesa a continuación por día y por oveja (orina de 24 horas). Cada día se toma una muestra de orina reciente por oveja después de haber alimentado a los animales. El examen de la pH de la orina se lleva a cabo inmediatamente usando un pH-metro.

5 Una vez a la semana (jueves), se toma una muestra de orina por oveja para examinar los portaobjetos de microscopio e investigar la presencia de microcristales. En la misma muestra, se mide la densidad de la orina y se investiga cualquier presencia de leucocitos utilizando tiras de orina.

1.54 medidas específicas en P1 y P2:

El Período 1 se utiliza para obtener valores con la dieta de control para cada una de las ovejas. El Período 2 es, estrictamente hablando, el período experimental.

10 Las fases de medición se llevan a cabo más de una semana para cada período, correspondiente a 5 días de mediciones. Los animales se disponen en jaulas un viernes (D13 para P1 y D20 para P2) y se retiran el viernes siguiente (D19 o D26, respectivamente, para P1 y P2).

» Las cantidades distribuidas se registran cada día: paja, piensos concentrados, agua, por día y por oveja.

15 » Las cantidades de pienso y paja rechazadas se registran por día y por oveja para determinar la ingestión.

» Las cantidades de agua bebida se calculan por día y por oveja.

» Orina: Inmediatamente después de la distribución de las dietas por la mañana, las bandejas llenas de orina se sustituyen por las bandejas vacías limpias.

20 La orina se pesa a continuación por día y por oveja (orina de 24 horas).

Después de la homogeneización, se toma una muestra doble por oveja. Se establece mediante la recopilación en cada matraz de 5% del volumen excretado durante el día por oveja. Los matraces se mantienen en el congelador. Por lo tanto, se establecen 16 muestras de orina al día de la muestra y por período (8 ovejas x 2 muestras).

25 Una muestra se envía al laboratorio (después de la agrupación) para el análisis; la otra se mantiene hasta que los análisis hayan sido validados.

• Procedimiento de Agrupamiento:

- Los recipientes de orina se descongelan.
- Se establece una agrupación de muestra de todas las recogidas diarias para cada animal y por período.
- Las muestras se envían al laboratorio para medir P.

30 Cada día se toma por oveja una muestra de orina reciente después de que haber alimentado a los animales. El examen de la pH de la orina se lleva a cabo inmediatamente usando un pH-metro.

35 Una vez a la semana (jueves), se toma una muestra de orina por oveja para examinar los portaobjetos de microscopio e investigar la presencia de microcristales. En la misma muestra, se mide la densidad de la orina y se investiga cualquier presencia de leucocitos utilizando tiras de orina.

» Se tomará la temperatura máxima para el día durante los períodos de medición.

» Se observará cualquier comportamiento anormal en una oveja o se anotará cualquier incidente. Se identificará a cualquier animal enfermo y sólo será tratado como un último recurso ya que el tratamiento puede conducir a la exclusión de la prueba.

40

1.55 Mediciones específicas en P2:

5 El Período 2 constituye el período experimental. Está diseñado para medir el efecto de VEVOVITALL (ácido benzoico) en la orina. Sin embargo, este producto nunca, en lo que conocen los autores de la invención, se ha utilizado en ovejas. En algunas especies (no rumiantes), en particular el gato, la ingesta conduce a trastornos. También puede causar un rechazo en algunos animales, dependiendo de la dosis administrada (cerdos). Por lo tanto, es importante durante la fase de adaptación y, en particular, durante la primera semana (D1 a D7) para verificar el comportamiento de los animales y para medir la ingestión a fin de abordar cualquier problema lo más rápidamente posible.

1.6 Análisis de Laboratorio

10 En concentrados: DM (materia seca), MM (materia mineral), TNM (materia nitrogenada total), CC (celulosa bruta), P (fósforo), Ca (calcio)

En la orina: - Fósforo - examen al microscopio para investigar e identificar microcristales. - Presencia de leucocitos mediante el examen de tiras de orina.

1.7 Variables

Variables explicativas: pienso, oveja.

15 Las variables a explicar: agua bebida, cantidades de orina, densidad de la orina, agua/relación de orina, fósforo urinario, pH, estado de microcristales urinarios. Modelo: $Y = \text{media} + \text{efectos de las variables explicativas} + \text{interacción} + \text{error}$.

2. Resultados

20 Todos los resultados del ensayo se exponen a continuación. Para más información, no fue posible mantener uno de los animales (animales C) en la prueba para el último período debido a problemas con los cálculos urinarios. Además, el animal D (lote testigo) fue alimentado con pienso 3044 en el período 3 debido a síntomas de los cálculos urinarios.

2.1 Situación de los animales al comienzo de la prueba

25 En la DO, los animales no presentaron ningún problema en particular. Los análisis de orina (pH y microcristales) no mostraron predisposiciones particulares reales en los animales a riesgos de cálculos. Sin embargo, el animal H presentó microcristales tras el examen de los portaobjetos. Por ello se decidió colocarlo en el grupo de animales alimentados con piensos 3044 (Vevovital 1) con el fin de evitar la introducción de cualquier sesgo en el lote de control ("falso positivo").

2.2 Peso de los animales

30 En general, los animales utilizados en esta prueba (Tabla 7) no presentaron problema alguno de pérdida excesiva de peso o ganancia.

Tabla 7: Peso de los animales (kg)

Peso de la oveja	A	B	C	D	E	F	G	H
Peso 0 – Inicio	73	84	87	80	74	85	78	71
Periodo 1								
Peso – Inicio	74	85	88	84	72	85	84	73
Periodo 2								
Peso – Inicio	73	85	ND	83	73	85	84	73
Periodo 3								

35 Uno de los animales (G) mostró una alta ganancia de peso (6 kg) en el período 1, probablemente debido a la reducción en la actividad física después del inicio de la prueba. Después se estabilizó su peso. No hubo evidencia de efecto alguno del pienso ($P = 0,85$) en el delta de peso entre P 2 y P 1.

2.3 Ingestión

Las cantidades de pienso y paja ingeridas se reseñan en las Tablas 8 y 9.

El pienso de control no fue rechazado. Uno de los animales rechazó el pienso VEVOVITALL 1, en particular durante la fase de adaptación. Aunque sólo se produjo en un animal, este resultado debe ser tomado en consideración.

5 **Tabla 8: Cantidades y tipos de piensos distribuidos**

		A	B	C	D	E	F	G	H
Periodo 1	Pienso	3042	3042	3042	3042	3042	3042	3042	3042
	Cantidad g/d (bruta)	1130	1260	1300	1200	1150	1270	1190	1110
Periodo 2	Pienso	3044	3043	3042	3042	3043	3044	3043	3044
	Cantidad g/d (bruta)	1150	1270	1300	1260	1120	1270	1260	1130
Periodo 3	Pienso	3042	3042	X	3044	3042	3042	3042	3042
	Cantidad g/d (bruta)	1135	1270	X	1250	1130	1270	1260	1135

Tabla 9: Consumo de paja

Paja en g/d (bruto)	A	B	C	D	E	F	G	H
Periodo 1	700	700	700	700	700	700	700	700
Periodo 2	700	700	700	700	700	700	700	700
Periodo 3	700	700	700	700	700	700	700	700

Los animales no rechazaron la paja.

2.4 Cantidades de agua bebida

10 Los resultados muestran una diferencia en la cantidad de agua bebida ($P = 0,06$) por los animales como una función del pienso dado durante el período 2. Los animales que recibieron el pienso control tenían un mayor consumo medio de agua (3481 g/d) que los animales que recibieron Vevovitall 0.5 (2964 g/d) que a su vez consumían más agua que los animales que recibieron Vevovitall 1 (2485 g/d).

Estos resultados sugieren la necesidad de agua en los animales que recibieron la dieta de control más alta que en los animales alimentados con las dietas que contenían ácido benzoico.

15 En el periodo 3, todos los animales aumentaron su consumo de agua ($P = 0,07$), siendo el promedio de 2,8 a 3,4 L de agua bebida, confirmando así los resultados anteriores.

2.5 Cantidades de orina excretada

20 Los resultados no mostraron diferencias ($P = 0,42$) en los volúmenes de orina (expresados en g/d) excretados por los animales. Sin embargo, excluyendo el animal C, que presenta una producción de orina alternativamente elevada (4241 g/d) y luego baja (400 g/d), el volumen de orina producida por los animales en los lotes a los que se dio pienso 3043 y 3044 (759,1 y 918,7 g/d, respectivamente), es decir, que contienen ácido benzoico, tiende a ser mayor que el de los animales que no recibieron ácido benzoico (578,2; $P = 0,06$). Por tanto, parece que el ácido benzoico tiende a fomentar la diuresis, más particularmente a una alta concentración.

25 Más notablemente, por encima del volumen excretado por los animales, es interesante señalar que el volumen de orina excretado por los animales que recibieron ácido benzoico es más constante que el de los animales que recibieron el pienso control. Por tanto, estos resultados parecen sugerir una mayor comodidad urinaria en los animales tratados con ácido benzoico.

30 Para recapitular, el volumen de orina diaria normal en una oveja es de entre 10 y 40 mL de orina/kg de peso vivo de acuerdo a Reece et al. 2009. (El sistema urinario, en; Functional anatomy and physiology of domestic animals, 4ª ed. Ames: Wiley-Blackwell, 312-358). Todos los resultados en animales en este ensayo están dentro de este intervalo (es decir, entre 0,7 y 3,5 L), aparte del animal C, en que el volumen superó ampliamente 4 L de orina o cayó por

debajo de 400 mL, y para los animales D (dieta de control), en donde la cantidades de orina se mantuvieron entre 70 y 1240 mL / 24 horas.

No se observó diferencia alguna entre los periodos 2 y 3 (P = 0,6).

5 El análisis de la relación del volumen de orina excretada a la cantidad de agua bebida por los animales confirma los resultados anteriores. De hecho, si el animal C se retira del análisis, la relación orina/agua bebida se eleva a 0,24, 0,31 y 0,46, respectivamente, para piensos 3042, 3043 y 3044, lo que sugiere que con la misma cantidad de agua bebida, la excreción de orina es mayor con benzoico ácido.

2.6 Densidad de orina

10 Recapitulando, la densidad teórica de la orina en ovejas está entre 1,015 y 1,045 cuando se mide por cistosíntesis. En nuestro caso, las muestras fueron tomadas utilizando un refractómetro en orina reciente, pero se recuperaron en tubos colocados debajo de las jaulas durante la micción espontánea, lo que necesariamente implica una ligera contaminación fecal de la orina y, por lo tanto, puede provocar un aumento moderado en la densidad de la orina. Sin embargo, ya que todas las muestras se obtuvieron de la misma manera, es posible comparar los lotes entre sí.

15 Los análisis (véase la Tabla 10) demuestran que la densidad de la orina de los animales que recibieron el pienso que contiene ácido benzoico es mayor que la de los animales que recibieron la dieta de control (P < 0,001).

Estos resultados sugieren una mejor capacidad de los riñones para concentrar la orina en los animales que recibieron ácido benzoico. De hecho, una densidad de orina por debajo de 1,02 (conocida como orina isostenúrica) en general refleja una disfunción del sistema urinario. En el periodo 3, con la alimentación de control, la densidad de la orina tiende a caer, de 1,043 a 1,030 (P = 0,1).

20 *Tabla 10: Densidad media de la orina*

Código del animal	Código del pienso	Tratamiento	Densidad media de orina en P2
A	3044	Vevovital 1	1,043
B	3043	VevoVital 0.5	1,058
C	3042	Control	1,020
D	3042	Control	1,021
E	3043	VevoVital 0.5	1,045
F	3044	Vevovital 1	1,046
G	3043	VevoVital 0.5	1,050
H	3044	Vevovital 1	1,040

2.7 Fósforo urinario

25 Los análisis de muestran que la concentración de fósforo urinario de los animales que recibieron la ración control (13,3 mg/kg) es significativamente mayor que en los animales que recibieron los piensos que contienen ácido benzoico (6,7 y 6,6 mg/kg, respectivamente, para piensos 3043 y 3044).

30 Un aumento en la concentración de fósforo en el pienso aumenta la concentración de iones fosfato en la orina (Radostits et al., 2000, Veterinary Medicine). El calcio contrarresta la absorción de fósforo por parte del intestino. Un bajo contenido en calcio en la ración provoca, por lo tanto, una alta excreción urinaria de fósforo. Las raciones basadas en gránulos se asocian con una fuerte incidencia de cálculos de estruvita. De hecho, la saliva de los rumiantes es rica en fósforo, y este fósforo de la saliva es eliminado por el tracto intestinal. Sin embargo, los gránulos necesitan menos masticación, por lo tanto menos saliva y, por consiguiente, por esta vía se elimina una menor cantidad de fósforo. Por lo tanto, la concentración urinaria se incrementa, fomentando estos cálculos (Schott et al., 2002, Large Animal Internal Medicine).

Por lo tanto, la adición de ácido benzoico a la ración permite reducir la concentración de fósforo en la orina.

35

2.8 pH de la orina

Recapitulando, los intervalos de variaciones en el pH de la orina habitualmente permitidos están comprendidos entre 7,8 y 8,5.

5 Los análisis muestran aquí un efecto leve del ácido benzoico en el pH de la orina. De hecho, el pH medio de la orina en los animales que recibieron la dieta de control es 8,62 frente a 8,43 y 8,40, respectivamente, para los animales que recibieron la alimentación que contiene ácido benzoico.

En el período 3, el pH de la orina tiende a aumentar en + 0,1 en promedio, lo que demuestra un efecto muy leve de ácido benzoico en el pH de la orina.

2.9 Estudio microscópico de la orina (investigación de microcristales)

10 El análisis de los portaobjetos de microscopio identificó la presencia o no de microcristales urinarios. Se ha dado una puntuación (Tabla 11), representando 0 una ausencia de cristales y 4 una orina que contiene una gran cantidad de cristales. Los portaobjetos se fotografiaron y se muestran en la Figura 1.

Después de la asignación de la puntuación, se llevó a cabo un análisis estadístico. Esto demuestra que la puntuación para los animales que recibieron la dieta de control en P2 es mayor ($P = 0,017$) que la de los animales que recibieron VevoVital.

15 *Tabla 11: Puntuación de orina como una función de la presencia o no de cristales en el período experimental P2*

Animal	Código de pienso en P2	Tratamiento	Puntuación de microcristales en P2
A	3044	Vevovital 1	0
B	3043	VevoVital 0.5	2
C	3042	Control	4
D	3042	Control	4
E	3043	VevoVital 0.5	1
F	3044	Vevovital 1	0
G	3043	VevoVital 0.5	1
H	3044	Vevovital 1	1

20 Los fotografías (Figura 1) muestran visualmente que no se detectaron cristales al final del tratamiento experimental con ácido benzoico al 1%, mientras que se observaron cristales grandes antes del tratamiento, o después de al final de la fase post-experimental en el mismo animal. Además de ello, también se observó en P2 una reducción en el número de cristales en el animal H (animal que presenta cristales en P1).

En el período 3, todos los animales presentan más cristales que en P2.

Por lo tanto, parece que VevoVital es eficaz para limitar la aparición de cristales urinarios en ovejas, probablemente por la reducción en el pH de la orina que la causa.

3. Conclusiones

25 Este estudio muestra un efecto positivo de las dietas que contienen ácido benzoico en el sistema urinario de ovejas.

El ácido benzoico alimentado a 0,5 hasta 1% en peso de la materia seca es eficiente en la reducción del número y tamaño de microcristales en la orina (urolitos) sin acidificar drásticamente la orina. Además, fomenta la excreción de la orina en el consumo de volumen idéntico de agua. También mejora la función urinaria, que se destaca por una mejor función de concentración de la orina.

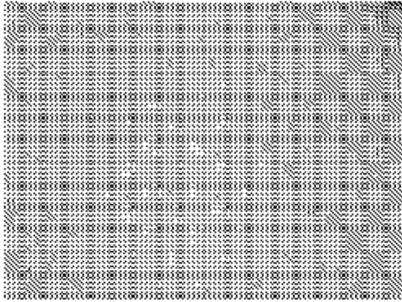
30 En conclusión, el ácido benzoico es eficaz en la prevención de la urolitiasis ovina.

REIVINDICACIONES

1. Concentrado de pienso que comprende ácido benzoico o una sal del mismo, para uso en el tratamiento y/o prevención de urolitiasis en rumiantes.
- 5 2. El concentrado de pienso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la sal de ácido benzoico es sal de sodio, potasio o calcio.
3. El concentrado de pienso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el rumiante se selecciona del grupo que consiste en ganado, ovejas y cabras.
4. El concentrado de pienso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la concentración del ácido benzoico o sal del mismo en el concentrado está entre 0,1 y 2% en peso de la ración diaria total.
- 10 5. El concentrado de pienso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la concentración del ácido benzoico o sal del mismo en el concentrado está entre 0,5 y 1% en peso de la ración diaria total.

Figura 1

Animal A, Periodo P2



Animal A, Periodo P3

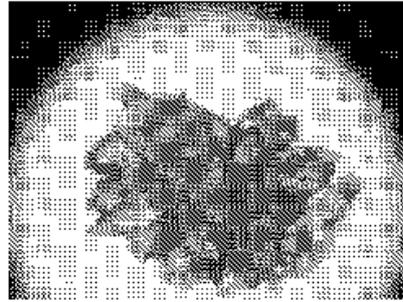


Figura 1: Imágenes de microscopía electrónica de una muestra de orina del animal A durante los periodos P2 y P3