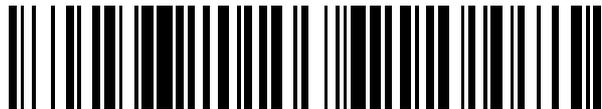


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 756**

51 Int. Cl.:

A61K 31/35 (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: **08.01.2009 E 09700797 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.08.2015 EP 2242490**

54 Título: **Mezcla de flavonoides cítricos para mejorar la fermentación ruminal**

30 Prioridad:

09.01.2008 EP 08150133

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

02.12.2015

73 Titular/es:

**INTERQUIM, S.A. (100.0%)
Joan Buscallà, 10
08173 Sant Cugat del Vallès, Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**SERRA, MARIA DEL MAR;
HEREDIA, FERNANDO;
CRESPO, FRANCISCO JAVIER y
BALCELLS, JOAQUIM**

74 Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 552 756 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

Mezcla de flavonoides cítricos para mejorar la fermentación ruminal

5 La presente invención se refiere al uso de una mezcla de flavonoides cítricos destinada a mejorar la fermentación ruminal.

ABREVIATURAS

10	AGV	Ácidos grasos volátiles
	ΔCt	Incremento de los ciclos de amplificación.
	$\Delta\Delta Ct$	Incremento en los ciclos de amplificación respecto a las muestras control en la PCR
	DGGE	Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante
	M. elsdenii	Megasphaera elsdenii
15	ns	No significativo
	PCR	Reacción de la polimerasa en cadena
	S. bovis	Streptococcus bovis

Los animales mamíferos no poseen enzimas digestivos adecuados para digerir los hidratos de carbono
 20 estructurales, i.e. la celulosa. Por ello y con el objetivo de poder acceder a esta fuente de nutrientes tan importante, los animales herbívoros han desarrollado unos compartimentos de fermentación donde se instaura una flora simbiótica que es capaz de digerirlos o fermentarlos. Estos compartimentos se sitúan bien antes de la digestión enzimática del animal hospedador (rumiantes) o posterior (fermentadores post-gástricos i.e. équidos, conejos). Los microorganismos del rumen utilizan, sólo parcialmente, estos carbohidratos y liberan, como productos de
 25 fermentación, ácidos grasos volátiles (ácidos acético, propiónico y butírico) que constituyen la fuente de energía más importante en los animales rumiantes. Los microorganismos que proliferan en el rumen son aquellos capaces de adaptarse a las condiciones del compartimiento y utilizar los alimentos ingeridos. Las diferentes fracciones de alimento, carbohidratos y proteínas se fermentan y la producción de AGV se complementa con el excedente de la biomasa que se genera en el rumen y que constituye a su vez la principal fuente de proteína absorbida finalmente en
 30 el duodeno.

Las bacterias que fermentan la celulosa (celulolíticas) crecen a un pH óptimo de 6.4-7 y producen más ácido acético que las bacterias que fermentan de almidón y azúcar (amilolíticas). Su pH óptimo se sitúa en torno a 5.5 y cuando estos niveles descienden, se incrementa la producción relativa de ácido láctico.

35 Con la intensificación de los sistemas de producción de rumiantes, la alimentación basada en forrajes ha sido sustituida por la administración de raciones concentradas formuladas con cereales, lo que incrementa los ritmos de crecimiento y reduce los costes de explotación. Sin embargo, las raciones concentradas o la sustitución de hidratos de carbono estructurales (celulosa) por hidratos de carbono solubles de rápida fermentación (almidón) lleva, sin embargo, a la aparición de ciertas disfunciones digestivas, i.e. acidosis y timpanismo.

La acidosis ruminal se puede definir como la alteración digestiva producida por ingestión de grandes cantidades de alimentos ricos en carbohidratos fermentables y es una de las disfunciones más comunes en el cebo de terneros. Puede desencadenar la muerte y empieza modificando la población bacteriana de Gram negativos a Gram positivos,
 45 favoreciendo el desarrollo de ciertas especies como S. bovis o Megasphaera elsdenii y modificando la proporción de AGV. También disminuye la proporción de ácido acético y propiónico y aumenta la de butírico y láctico. El aumento de ácido láctico afecta la motilidad ruminal produciendo meteorismo por la incapacidad de eliminar el gas producido. Las manifestaciones de un cuadro agudo son anorexia, heces acuosas amarillo verdosas, atonía ruminal, cojeras, retracción abdominal y deshidratación. Las formas subagudas comprenden meteorismo frecuente, pelo anormal y
 50 aparición de abscesos hepáticos, que son observables en el despiece.

El timpanismo o meteorismo se define como una alteración digestiva causada por la excesiva producción y acumulación de gas procedente de la fermentación (dióxido de carbono y metano) lo que provoca una distensión anormal en el retículo-rumen.

55 Convencionalmente la adición de sustancias antibióticas (ionóforos tales como la monensina) ha mantenido las disfunciones ruminales citadas previamente en un estado latente. Sin embargo la retirada paulatina de dichas sustancias como promotores de crecimiento ha desencadenado la aparición de estas patologías y ello se ha traducido en tasas de mortalidad o morbilidad elevada que tienen un efecto negativo en la rentabilidad de la explotación. El impacto de esta gestión sobre la productividad de las explotaciones es tan importante que son
 60 necesarias alternativas a estas sustancias antibióticas.

La patente US4443471 se refiere a diversos derivados químicos de los potenciadores de crecimiento de rumiantes M-139603 y M-139603 y a su uso en la reducción de la proporción de metano producida por la fermentación ruminal.

La patente US5196432 se refiere al uso de antagonistas de los adrenoceptores alpha-2 en el tratamiento de los rumiantes afectados de acidosis láctica.

La patente US5709894 describe un aditivo alimentario para rumiantes que comprende productos de fermentación del ácido glutámico y del maíz para aumentar la fermentación ruminal.

10 La solicitud de patente US2003165487 describe procedimientos y composiciones basadas en el enzima amilasa de *Aspergillus oryzae* para mejorar la eficiencia de la fermentación ruminal y prevenir el aumento perjudicial de las concentraciones de ácido láctico ruminal, así como para promover el crecimiento de los microorganismos ruminales beneficiosos.

15 La solicitud de patente US2004009209 describe un procedimiento para mantener sano el rumen en ruminantes consistente en una mezcla de molasas de baja humedad y un agente tampón.

La solicitud PCT WO9119489 aporta un procedimiento para regular los niveles del pH ruminal por administración de sales del ácido succínico y de otros ácidos carboxílicos en rumiantes alimentados con raciones altamente energéticas.

La solicitud PCT WO9325616 se refiere a un preparado de almidón encapsulado en una matriz derivada de la reacción de Maillard de proteínas heterólogas solubles y de azúcares reductores para la mejora de la eficiencia de la fermentación microbiana en el rumen de animales rumiantes.

25 La solicitud PCT WO2004009104 se refiere a una nueva cepa de *M. elsdenii* y a sus usos, incluyendo la prevención y el tratamiento de la acidosis láctica en rumiantes.

La solicitud PCT WO2005000035 se refiere a un procedimiento para mejorar la fermentación ruminal y en particular reducir la metanogénesis, consistente en la administración a los rumiantes de un extracto soluble de alfalfa obtenido a partir de alfalfa fresca.

La EP1323354 describe un aditivo alimentario natural basado en material vegetal.

35 Es conocido alimentar al ganado con subproductos de cultivos agrarios y del procesado industrial de alimentos. Por ejemplo, subproductos cítricos alimentarios pueden ser usados como componentes de sistemas alimentarios para rumiantes. Estos contienen una variedad de substratos energéticos para los microbios del rumen (Bampidis et al. *Animal Feed Science and Technology*, Elsevier, vol. 128, 2006, 175-217). JP-52 028922 describe un medicamento que contiene entre otros componentes, piel de naranja amarga. Este medicamento se administra a caballos, vacas y aves.

Los inventores de la presente solicitud han descubierto que una mezcla de flavonoides cítricos, específicamente la naringina, extracto de naranja amarga y sepiolita es capaz de regular los procesos de fermentación microbiana derivados de la administración de raciones concentradas en rumiantes, incrementando la eficiencia de los procesos de fermentación microbiana y limitando el crecimiento de ciertas especies directamente relacionadas con los procesos de acidosis ruminal, específicamente *S. bovis*.

Así, la presente invención se refiere a una mezcla que comprende naringina, extracto de naranja amarga y sepiolita para su uso en la mejora de la fermentación ruminal en rumiantes.

50 En la presente solicitud el concepto "rumiante" incluye las especies de bovinos, ovinos, caprinos y camélidos.

Esta mezcla presenta un conjunto de ventajas frente al estado de la técnica que la hace sumamente valiosa en el área de la nutrición de especies rumiantes. Las ventajas a destacar son que todos los ingredientes de la mezcla son productos de origen natural y son fácilmente asequibles. Por otra parte, la mezcla es de fácil manejo y puede prepararse de acuerdo con los procedimientos industriales de formulación conocidos por los expertos en la materia. Asimismo, la mezcla tiene la ventaja adicional de limitar el crecimiento de ciertas bacterias causantes de la acidosis ruminal, especialmente el *S. bovis*. Así, la presente invención se refiere en particular a dicha mezcla para su uso en la mejora de la fermentación ruminal causada por un desajuste de la flora bacteriana natural del rumen. La presente invención también se refiere a dicha mezcla para su uso en la prevención de la disminución de la fermentación ruminal que puede ser causada por un desajuste de la flora bacteriana natural del rumen. Un propósito particular del uso de la mezcla de la invención es limitar el crecimiento de las bacterias que causan acidosis ruminal tales como *Lactobacillus* spp., por ejemplo *Lactobacillus acidophilus* y especialmente *S. bovis*.

La mezcla es activa cuando se incorpora en el pienso en forma sólida en concentraciones del orden de 100 a 300 ppm (de 100 a 300 g/tonelada de pienso). Ello se basa en los estudios realizados in vitro en los que se analizó el efecto de la mezcla natural a dosis que variaron entre 100 y 300 ppm.

5 Según un aspecto, la cantidad de naringina en la mezcla de la invención es del 10% al 25%, preferentemente del 15% al 25% y más preferentemente alrededor del 20% en peso.

10 Según un segundo aspecto de la invención, la cantidad de extracto de naranja amarga en la mezcla de la invención es del 10% al 65%, preferentemente del 20% al 60% y más preferentemente alrededor del 40% en peso. Hay que destacar que el extracto de naranja amarga comprende naringina y por lo tanto la cantidad total de naringina en la mezcla de la invención será mayor que la cantidad arriba indicada.

15 Según un tercer aspecto, la cantidad de naringina, extracto de naranja amarga y sepiolita es del 100% del peso de la mezcla.

20 En una primera realización, la invención se refiere a una mezcla que comprende del 10% al 25% en peso de naringina, del 10% al 65% en peso de extracto de naranja amarga y una cantidad suficiente hasta el 100% en peso (el balance de la mezcla) de sepiolita, para su uso en la mejora de la fermentación ruminal en rumiantes.

25 En una realización derivada de la anterior, la mezcla comprende del 15% al 25% en peso de naringina, del 20% al 60% en peso de extracto de naranja amarga y la cantidad suficiente hasta el 100% de sepiolita y, más específicamente, el 20% en peso de naringina, el 40% en peso de extracto de naranja amarga y el 40% en peso de sepiolita.

30 Las proporciones arriba indicadas (% en peso) se refieren al peso total de la mezcla.

35 En otra realización, la mezcla para usar de más arriba regula los procesos de fermentación microbiana derivados de la administración de raciones alimenticias concentradas.

40 En otra realización, la mezcla para usar de más arriba limita el crecimiento de bacterias causantes de la acidosis ruminal, específicamente el *S. bovis*. Así, la presente invención se refiere a la mezcla arriba descrita para usar en la prevención o tratamiento de la acidosis ruminal, incluyendo las formas agudas y subagudas descritas en el presente documento.

45 En otra realización, la mezcla para usar de más arriba optimiza la producción en el engorde intensivo de rumiantes, especialmente terneras.

50 En otra realización, la mezcla para usar de más arriba comprende la adición al pienso en forma sólida a concentraciones de 10 a 2000 ppm en peso, específicamente de 50 a 1000 ppm, y aún más específicamente de 100 a 300 ppm.

55 Los flavonoides son una clase de pigmentos vegetales hidrosolubles de creciente interés medicinal. La naringina es un flavonoide, concretamente una flavanona glicosilada, que se extrae de la piel de algunos cítricos (pomelo, *Citrus paradisi*, y naranja amarga, *Citrus aurantium*) y es el principal responsable de su sabor amargo. Está presente también en la pulpa de los frutos, en hojas, flores y semillas de la planta.

60 Algunos estudios sugieren que la biosíntesis de la naringina, como la de otras flavanonas, está influenciada por factores ambientales y genéticos, determinando variaciones en los niveles de concentración de estos compuestos, estimado entre 15 a 18 g por kg de cáscara fresca de pomelo como valor frecuente de concentración. Además, la cantidad de piel varía, siendo mayor en frutos inmaduros que en maduros.

65 Usada en perfumería y para dar sabor a golosinas, bebidas y productos de panadería, la naringina continúa siendo usada por sus propiedades antioxidantes y antimutagénicas, y como estabilizadora de aceites.

70 El extracto de naranja amarga puede obtenerse de frutas cítricas (especialmente *Citrus aurantium*) mediante operaciones ordinarias en la técnica tales como extracción, filtración, concentración, precipitación, clarificación y secado final. Los procesos de extracción pueden llevarse a cabo en sistemas binarios alcohol/agua, donde el alcohol se selecciona entre metanol, etanol, propanol y similares. Se usa preferentemente metanol. Un extracto de naranja amarga típico comprenderá del 31,5 al 71,5% en peso, p.e. del 45 al 55% en peso de flavonoides totales (si se determina mediante HPLC). Los flavonoides en particular incluyen naringina, neohesperidina y poncirina. Típicamente, el contenido total de flavonoides comprenderá (a) del 17,5 al 35,1 % en peso, p.e. del 25 al 27 % en

peso, de naringina, (b) del 7,7 al 16,9 % en peso, p.e. del 11 al 13 % en peso, de neohesperidina y (c) del 2,1 al 6.5 % en peso, p.e. del 3 al 5 % en peso, de poncirina.

A su vez, la sepiolita es un silicato natural hidratado de magnesio que debe su origen a la sedimentación calcárea de fósiles marinos. Se trata de un mineral de arcilla de color blanco o con ligera coloración amarilla. Se ha utilizado desde antiguo como pasta dental en polvo.

La mezcla de la presente invención se administra a ruminantes que sufren o tienen riesgo de sufrir un deterioro de la fermentación ruminal. Tales ruminantes incluyen en particular:

- 10 1) Ruminantes alimentados con dietas altamente concentradas (cereales), p.e. para mejorar la eficiencia alimentaria e impedir la aparición de procesos de quetosis, especialmente si el rumiante es
 - a) un animal de engorde bajo un sistema intensivo;
 - b) una hembra con producción alta de leche en el pico de lactancia, cuando el aporte del concentrado alcanza la mayor proporción; o
- 15 c) una oveja o cabra en avanzado estado de gestación que lleva más de una cría cuya capacidad de ingesta ha sido reducida.
 - 2) Ruminantes sujetos a cambios de dieta repentinos, especialmente si el cambio es
 - a) desde pasto (forraje) a raciones altamente concentradas; o
 - b) desde almidón poco digerible (sorgo o maíz) a uno muy digerible (trigo o cebada).

20 A modo de ilustración simplemente, se aporta el siguiente ejemplo a fin de una mayor comprensión de la invención.

Ejemplo 1: Efectos de la mezcla en terneros a dosis de 100 y 300 ppm.

25 La dinámica de fermentación se analizó a partir del protocolo propuesto por Theodorou M K et al., Animal Feed Science and Technology, 48 (3), p.185-197, Aug 1994. Para ello se utilizó inóculo líquido ruminal de terneros procedentes de explotaciones comerciales en régimen de cebo intensivo. La mezcla de la invención se incubó con el inóculo y pienso comercial de terneros (600 mg) suplementado con paja de cereales en las proporciones habituales (80:20; concentrado: paja). Las dosis de mezcla se incubaron por triplicado en dos tandas (2 terneros) en botellas herméticamente cerradas con 800 mL de una dilución del inóculo.

30 La prueba tuvo una duración de 48 horas registrándose la presión en el interior de la botella a las 2, 4, 6, 12, 24, 36 y 48 h. A partir de los valores de presión se estableció la producción de gas. Tras 10 horas de incubación una de las botellas fue apartada y se procedió al muestreo del contenido para la determinación de AGV y aislamiento del DNA que se utilizó para las pruebas de genética molecular.

35 La extracción de DNA se realizó mediante un QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen Ltd, Crawley, West Sussex, UK). La concentración y pureza del DNA (DNA total) fue determinada espectrofotométricamente (NanoDrop®) midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm.

40 La cuantificación del DNA bacteriano y del *S. bovis* se realizó mediante PCR a tiempo real mediante el equipo ABI PRISM® 7000, Sequence Detection System, utilizando cebadores específicos para bacterias totales (Maeda H et al., FEMS Immunology and Medical Microbiology, 39 (1), p.81-86, Oct 2003) y de *S. bovis* (Tajima K et al., Applied and Environmental Microbiology, 67 (6), p.2766-2774, Jun 2001). Como referencia para calcular la concentración de bacterias totales en el medio se utilizó un concentrado de DNA de muestras de bacterias obtenidas por centrifugación diferencial del líquido ruminal (500 g, 10 min., seguido por 20,000 g, 20 min.). La abundancia de *S. bovis* se expresó de forma relativa al de bacterias totales utilizando la expresión $\Delta\Delta C_t$ descrita por Livak K J et al., Methods (San Diego, Calif.), 25 (4), p.402-408, Dec 2001.

45 50 Los estudios de biodiversidad bacteriana se realizaron mediante DGGE utilizando cebadores específicos (Nübel U et al., Journal of Bacteriology, 178 (19), p.5636-5643, Oct 1996). La electroforesis se realizó en un gel de acrilamida al 8% con un gradiente desnaturante de urea/formamida, comprendido al 50-65%, durante 16 horas a 80V. La tinción del gel se realizó utilizando el kit Amersham Biosciences (Suecia) y tras ser escaneados se analizó el patrón de bandas mediante el programa UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Arithmetic averages).

55 El efecto de la mezcla sobre la fermentación ruminal se analizó según un diseño factorial 2 x 2 (mezcla x dosis), considerando el animal como bloque experimental.

RESULTADOS

60 1.- Producción de gas

En las condiciones in vitro descritas previamente, la inclusión de la mezcla en el medio no tuvo ningún efecto, ni en la cinética de producción de AGV ni en la producción total de AGV. El tratamiento experimental tampoco afectó a las proporciones molares de los AGV más importantes, que mostraron una proporción media de 60 % de ácido acético, 29 % de ácido propiónico y 9 % de ácido butírico.

5

2.- Cuantificación bacteriana por PCR a tiempo real

En la Tabla 1 se presenta la concentración total de DNA obtenida por espectrofotometría (260 nm) y en ella se aprecia como la concentración de DNA en el medio de cultivo no era modificada por la inclusión de la mezcla. Sin embargo, la determinación de la cantidad de DNA bacteriano mediante un procedimiento más específico, la PCR a tiempo real, permitió observar cómo la inclusión de la mezcla daba lugar a un incremento significativo en DNA bacteriano que refleja un incremento en el crecimiento bacteriano. La existencia de diferencias significativas en el crecimiento microbiano derivadas de la presencia de la mezcla, sin que dichas diferencias puedan constatarse ni en la producción de gas (CO₂ + NH₃) ni en una mayor liberación de AGV al medio, indica un efecto positivo de la mezcla sobre la eficiencia de la síntesis microbiana.

En la misma tabla se presenta también la concentración de copias de secuencias específicas de DNA para el *S. bovis*, habiéndose identificado esta bacteria como una de las principales productoras de ácido láctico y por tanto relacionada con las patologías derivadas de una acidosis ruminal. La adición de la mezcla produjo una limitación significativamente alta de la concentración de la especie en el medio, siendo expresada dicha concentración como número de copias de DNA correspondientes a *S. bovis* (2(Δ Ct)*1000) en relación al número total de copias de DNA bacteriano o como una reducción en el porcentaje del número de copias frente al medio control (2($\Delta\Delta$ Ct)).

Tabla 1: Concentración de diferentes tipos de DNA en el medio de cultivo calculada mediante PCR a tiempo real. Se presenta también el número de copias 16S DNA en el medio como índice de la biodiversidad bacteriana

Dieta		Control	Mezcla		Significación		
Dosis (ppm)			100	300	RSD	Dieta	Dosis
DNA Total	(μ g/ml)	37,3	39.7	32.3	6,98	ns	ns
DNA Bacteriano	(μ g/ml)	8,19	24.3 b	21.5b	2,75	0,0018	ns
<i>S. bovis</i>	2(Δ Ct) *1000	4,03	1.17 b	1.1 b	0,84	0,01	ns
<i>S. bovis</i>	2($\Delta\Delta$ Ct)		0,31	0.29	0,14		ns
DGGE	N	15,50	15,0	15.9	1,44	ns	ns

Al analizar el efecto dosis de la mezcla sobre los parámetros anteriores, no se aprecian diferencias significativas con la concentración de la mezcla. Por tanto, los resultados obtenidos sugieren que las concentraciones iniciales de 100 y 300 ppm exceden el umbral de actividad de dichos compuestos sobre los procesos de fermentación ruminal. Por otra parte, aunque la mezcla objeto del presente estudio modificó la concentración de *S. bovis*, no modificó la biodiversidad de la población. Esto confirma el efecto selectivo de dichas sustancias sobre ciertas poblaciones microbianas.

35

3.- Conclusiones y ventajas

La suplementación de la mezcla en estudio sobre inóculos procedentes de raciones alimenticias concentradas administradas en condiciones de cebo intensivo comercial da lugar a variaciones significativas en los procesos de fermentación ruminal.

40

La presencia de la mezcla no modifica los niveles de producción de gas ni de AGV. Sin embargo, muestra un efecto significativo sobre las diferentes poblaciones microbianas del inóculo. Así, mientras promueve un incremento significativo en los niveles de síntesis en la población, reprime significativamente el crecimiento de *S. bovis*.

45

REIVINDICACIONES

1. Mezcla que comprende del 10 al 25 % en peso de naringina, del 10 al 65% en peso de extracto de naranja amarga y la cantidad suficiente hasta el 100 % en peso de sepiolita para su uso en la mejora de la fermentación ruminal en rumiantes, en donde dicha mejora comprende limitar el crecimiento de las bacterias que causan acidosis ruminal.
2. Mezcla de la reivindicación 1, donde la mezcla comprende del 15 al 25 % en peso de naringina, del 20 al 60 % en peso de extracto de naranja amarga y la cantidad suficiente hasta el 100 % de sepiolita.
3. Mezcla de la reivindicación 2, donde la mezcla comprende el 20 % en peso de naringina, el 40 % en peso de extracto de naranja amarga y el 40 % en peso de sepiolita.
4. Mezcla de las reivindicaciones 1 a 3 donde el extracto de naranja amarga comprende del 31,5 al 71,5% en peso de total de flavonoides.
5. Mezcla de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde el extracto de naranja amarga comprende del 44 al 55% en peso del total de flavonoides.
6. Mezcla de la reivindicación 4 ó 5 donde el total de flavonoides comprende (a) del 17,5 a 35,1% en peso de naringina, (b) del 7,7 al 16,9% en peso de neohesperidina y (c) del 2,1 al 6,5% en peso de poncirina.
7. Mezcla de la reivindicación 4 ó 5 donde el total de flavonoides comprende (a) del 25 a 27% en peso de naringina, (b) del 11 al 13% en peso de neohesperidina y (c) del 3 al 5% en peso de poncirina.
8. Mezcla de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde dicha mejora regula los procesos de fermentación microbiana en rumiantes a los que se administra raciones alimenticias concentradas.
9. Mezcla de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 donde la bacteria causante de la acidosis ruminal es el *Streptococcus bovis*.
10. Mezcla de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde dicha mejora optimiza la producción del engorde intensivo de rumiantes.
11. Mezcla de la reivindicación 10 donde los rumiantes son terneras.
12. Mezcla de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende la adición de la mezcla al pienso en forma sólida a concentraciones de 10 a 2000 ppm en peso.
13. Mezcla de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende la adición de la mezcla al pienso en forma sólida a concentraciones de 50 a 1000 ppm en peso.
14. Mezcla de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que comprende la adición de la mezcla al pienso en forma sólida a concentraciones de 100 a 300 ppm en peso.
15. Uso de una mezcla que comprende del 10 al 25 % en peso de naringina, del 10 al 65% en peso de extracto de naranja amarga y la cantidad suficiente hasta el 100 % en peso de sepiolita en la fabricación de un medicamento para mejorar la fermentación ruminal en rumiantes, en donde dicha mejora comprende limitar el crecimiento de las bacterias que causan acidosis ruminal.

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

10

- US 4443471 A [0009]
- US 5196432 A [0010]
- US 5709894 A [0011]
- US 2003165487 A [0012]
- US 2004009209 A [0013]
- WO 9119489 A [0014]
- WO 9325616 A [0015]
- WO 2004009104 A [0016]
- WO 2005000035 A [0017]
- EP 1323354 A [0018]
- JP 52028922 A [0019]

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

15

- **BAMPIDIS et al.** *Animal Feed Science and Technology*. Elsevier, 2006, vol. 128, 175-217 [0019]
- **THEODOROU M K.** *Animal Feed Science and Technology*, August 1994, vol. 48 (3), 185-197 [0042]
- **MAEDA H et al.** *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, October 2003, vol. 39 (1), 81-86 [0045]
- **TAJIMA K et al.** *Applied and Environmental Microbiology*, June 2001, vol. 67 (6), 2766-2774 [0045]
- **LIVAK K J et al.** *Methods*, December 2001, vol. 25 (4), 402-408 [0045]
- **NÜBEL U et al.** *Journal of Bacteriology*, October 1996, vol. 178 (19), 5636-5643 [0046]

20