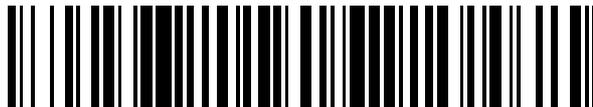


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 288**

51 Int. Cl.:

A23K 1/18 (2006.01)

A23K 1/16 (2006.01)

C11C 3/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2010 E 10719080 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2015 EP 2410871**

54 Título: **Composiciones que contienen monoglicéridos de ácido orgánico de C1 a C7 y glicerol, su preparación y su uso como antibacterianos y agentes anti-moho**

30 Prioridad:

16.03.2009 IT FI20090050

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

25.01.2016

73 Titular/es:

CANTINI, FERNANDO (100.0%)
Via Scipione Ammirato 98
50136 Firenze, IT

72 Inventor/es:

CANTINI, FERNANDO

74 Agente/Representante:

RUO, Alessandro

ES 2 557 288 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

Composiciones que contienen monoglicéridos de ácido orgánico de C1 a C7 y glicerol, su preparación y su uso como antibacterianos y agentes anti-moho

5

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere al campo de las composiciones para alimentos para animales.

10

Estado de la técnica

[0002] El problema más común que se sabe que afecta a los animales de granja y de compañía es el daño causado por las infecciones bacterianas y micotoxinas producidas por mohos ingeridos con su alimentación. En cuanto a las infecciones bacterianas y, en particular a las infecciones intestinales, estas a menudo se presentan con diarrea intensa que puede comprometer, incluso en un grado importante, la salud del animal y, por consiguiente, los ingresos de la granja como un todo.

15

[0003] En cuanto a las micotoxinas producidas por mohos, sus efectos tóxicos sobre órganos específicos y sobre las funciones fisiológicas de los animales, y su capacidad para causar enfermedades tales como toxicosis, se conocen desde hace algunos años. También se sabe que las micotoxinas cancerígenas, tales como aflatoxinas producidas por mohos de la cepa de *Aspergillus*, pueden transmitirse desde la leche de vaca o de cabra al ser humano debido a que son estables y no pueden eliminarse con los tratamientos de calor normales. La ocratoxina A es producida por especies de *Aspergillus* y *Penicillium*; si está presente en la alimentación, puede causar enfermedades renales graves en especies de cerdos y de aves.

20

25

[0004] La toxina T-2, producida por especies de *Fusarium*, puede causar necrosis del tracto digestivo de los animales.

[0005] Normalmente se trata de superar estos inconvenientes mediante el uso de ácidos orgánicos de cadena corta, ya sea solos o en mezcla, tales como: ácido fórmico ($C_1H_2O_2$), ácido acético ($C_2H_4O_2$), ácido propiónico ($C_3H_5O_2$), ácido láctico ($C_3H_6O_2$), ácido fumárico ($C_4H_4O_4$), ácido butírico ($C_4H_8O_2$), ácido cítrico ($C_6H_8O_7$) y ácido benzoico ($C_7H_6O_2$).

30

[0006] Entre las limitaciones del uso de dichos ácidos orgánicos se encuentra su fuerte acción corrosiva que puede dañar cualquier equipo con el que entran en contacto. Las formas salificadas con amonio, calcio, sodio o potasio también producen una acción corrosiva que, aunque más limitada, no obstante está presente.

35

[0007] También hay ciertas restricciones fisiológicas a la acción de ácidos orgánicos como tales o en forma salificada cuando se utilizan como agentes antibacterianos en las dietas de animales; a este respecto se sabe que los ácidos orgánicos requieren un pH ácido con el fin de realizar la acción antibacteriana real, porque en estas condiciones están presentes en la forma no disociada RCOOH. Esta forma no disociada RCOOH pasa a través de las paredes celulares de microorganismos y, una vez dentro, se disocia de acuerdo con el pH intracelular. Para mantener su pH intracelular del microorganismo expulsa H^+ ; el nivel de ácido orgánico disociado, por lo tanto, aumenta y, ya que no sale del microorganismo, lo mata.

40

45

[0008] En los intestinos, sin embargo, el pH es ligeramente básico (aproximadamente 7), por lo que la presencia de ácido orgánico en forma no disociada es muy limitada, y, en consecuencia, la función antibacteriana es también muy limitada.

50

[0009] A la luz de lo anterior, por lo tanto, hay una necesidad evidente de desarrollar nuevas composiciones capaces de contrarrestar los efectos de los mohos y las bacterias presentes en los alimentos de origen animal, pero que no presenten los inconvenientes mencionados.

[0010] La técnica de la microencapsulación de ácidos orgánicos con sustancias lipídicas se desarrolló como un método para suministrar ácido orgánico a los intestinos y disminuir el pH en los mismos, pero los resultados obtenidos son más bien insatisfactorios debido a la acción de tamponamiento del bicarbonato de sodio producida por el páncreas como regulador intestinal del pH. Es más, además de no ser muy eficaz, esta tecnología también es muy costosa.

55

[0011] La acción antibacteriana de ciertos monoglicéridos de ácido graso se ha investigado en una serie de estudios, por ejemplo:

60

1. J. Kabara, Dennis M. Swieczkowski, Anthony J. Conley, Joseph P. Truant 1972 FATTY ACIDS AND DERIVATES AS ANTIMICROBIAL AGENTS.

65

2. G. Bergsson, J. Arnfinnsson S. Karlsson, O. Steingrímsson, H. Thormar 1998. IN VITRO INACTIVATION OF CHLAMYDIA TRACHOMATIS BY FATTY ACIDS AND MONOGLYCERIDES.

3. G. Bergsson, J. Arnfinnsson O. Steingrimsson, H. Thormar 2001. IN VITRO KILLING OF CANDIDA ALBICANS BY FATTY ACIDS AND MONOGLYCERIDES.

4. H. Thormar, H. Hilmarsson, G. Bergsson 2005. STABLE CONCENTRATED EMULSIONS OF THE 1-MONOGLYCERIDE OF CAPRIC ACID (MONOCAPRIN) WITH MICROBICIDAL ACTIVITIES AGAINST THE FOOD-BORNE BACTERIA CAMPYLOBACTER JEJUNI, SALMONELLA SPP AND ESHERICHIA COLI; PCT/IS2005/000026 "STABLE CONCENTRATED ANTI-BACTERIAL EMULSIONS OF MONOCAPRIN IN WATER".

5. Hilmarsson, H. Thormar, J. H. Thrainsson, E. Gunnarsson 2006 EFFECT OF GLYCEROL MONOCAPRATE (MONOCAPRIN) ON BROILER CHICKENS: AN ATTEMPT AT REDUCING INTESTINAL CAMPYLOBACTER INFECTION.

[0012] Estos estudios han puesto de relieve una dirección de investigación prometedora, pero no exhaustiva. SU 701 631 describe la elevada potencia bactericida del monoglicérido de ácidos propiónicos y su actividad supresora de hongos.

[0013] Mauro Antongiovanni et al. " Effect of dietary butyric glycerides on immune response and Salmonella enteritidis in broiler chicks" en Proceedings of 16th European Symposium on poultry nutrition, 2007, XP002551416 Strasburg, Francia informa del efecto de modulación inmune de los glicéridos butíricos sobre la inmunoglobulina sérica y sobre la colonización por *Salmonella enteritidis* colonización; se describe el efecto neto de los glicéridos butíricos en el control de la infección por Salmonella.

[0014] Mauro Antongiovanni et al. "Butyric Acid glycerides in the diet of broiler chickens: effects on gut histology and carcass composition" en Ital. J. Anim. sci. Vol. 6, 19 – 25 (2007) describe los efectos de los ácidos glicéridos butíricos como ingrediente complementario en la dieta sobre el rendimiento en vivo de pollos de engorde y sobre la morfología de su intestino delgado.

[0015] El documento CA 1 168 078 describe que monobutirina y monopropionina se pueden utilizar en composiciones de alimentos de humedad intermedia, posiblemente con conservante habitual para prevenir el crecimiento de bacterias y mohos; no hay ninguna mención de una premezcla de monobutirina o monopropionina con glicerol antes de la aplicación sobre los productos a tratar.

[0016] En la medida en que lo permiten los conocimientos actuales, no hay estudios que confirmen la acción específicamente antibacteriana y anti-moho de composiciones de monoglicéridos de ácidos grasos de cadena corta combinados con glicerol.

Breve descripción de las figuras

[0017]

La figura 1 es una suspensión acuosa de una composición de la invención mostrada por microscopia electrónica.

La figura 2 muestra alimentos sin tratar inoculados con Fusarium.

La Figura 3 muestra alimentos inoculados con Fusarium y tratados con 0,7 % de monopropionina 43.

Sumario de la invención

[0018] La presente invención se refiere a composiciones que contienen monoglicéridos de ácidos grasos de C₁ a C₇ en porcentajes entre el 10 % y el 90 %, y glicerol entre 10 y 90 % en peso (calculado sobre el peso total de la composición) como antibacterianos y agentes anti-moho que se añaden a cereales, piensos y a productos alimentarios en general y al agua de bebida destinados a la alimentación de animales.

Descripción detallada de la invención

[0019] Sorprendentemente, se ha encontrado que las composiciones que contienen ésteres de monoglicéridos de ácidos orgánicos de C₁ a C₇ combinados con glicerol tienen una fuerte potencia antibacteriana tanto a pH ácido (4,5) como a pH neutro, como está presente en los intestinos de los animales (es decir, pH 7).

[0020] En las composiciones de la invención, los ésteres de monoglicéridos de ácidos orgánicos como de han definido anteriormente están presentes en cantidades entre 10 % y 90 % y el glicerol entre 10 y 90 % en peso (calculado sobre el peso total de la composición); preferentemente dichas cantidades están entre 40 % -90 %, y 10 % -60 %, respectivamente.

[0021] La expresión "ácidos orgánicos de C₁ a C₇" de acuerdo con la invención se refiere preferentemente a los siguientes ácidos: ácidos fórmico, acético, propiónico, láctico, butírico, cítrico, fumárico y benzoico.

[0022] El ácido butírico y el ácido propiónico son particularmente preferidos.

[0023] Los ejemplos de las composiciones de acuerdo con la invención son composiciones que consisten en:

(a)

éster monoglicérido de ácido butírico	42 – 47 %
éster diglicérido de ácido butírico	5 – 8 %
éster triglicérido de ácido butírico	0,5 – 2 %
glicerol	45 – 50 %

(b)

éster monoglicérido de ácido propiónico	45 – 50 %
éster diglicérido de ácido propiónico	8 – 12 %
éster triglicérido de ácido propiónico	1 – 3 %
glicerol	36 – 40 %

5 Los ejemplos específicos de las composiciones de acuerdo con la invención son composiciones que consisten en:

(c)

éster monoglicérido de ácido butírico	45 %
éster diglicérido de ácido butírico	6 %
éster triglicérido de ácido butírico	1 %
glicerol	48 %

(d)

monoglicéridos de ácido butírico	43 %
diglicéridos de ácido butírico	6 %
triglicéridos de ácido butírico	1 %
glicerol	50 %

10

(e)

éster monoglicérido de ácido propiónico	49 %
éster diglicérido de ácido propiónico	10 %
éster triglicérido de ácido propiónico	2 %
glicerol	39 %

(f)

monoglicéridos de ácido propiónico	43 %
diglicéridos de ácido propiónico	6 %
triglicéridos de ácido propiónico	1 %
glicerol	50 %

15 **[0024]** Los valores de potencia antibacteriana de ácidos orgánicos solos comparados con los de las composiciones de la invención se dan a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1

PRODUCTO	CONC. USADA	pH	E. coli (ufc/ml)	Salmonella typhimurium (ufc/ml)	Campylobacter jejuni (ufc/ml)
Control positivo		7	108 x 10 ⁵	120 x 10 ⁵	431 x 10 ⁵
Control positivo		4,5	34 x 10 ⁵	96 x 10 ⁵	201 x 10 ⁵
Ácido propiónico	1:909	7	54 x 10 ⁴	11 x 10 ⁴	33 x 10 ³
Ácido propiónico	1:909	4,5	13 x 10 ⁴	42 x 10 ³	14 x 10 ¹
Ácido butírico	1:1000	7	106 x 10 ⁴	65 x 10 ⁴	18 x 10 ³
Ácido butírico	1:1000	4,5	78 x 10 ⁴	25 x 10 ³	2 x 10 ¹
Monopropionina 43	1:109	7	110 x 10 ⁴	12 x 10 ³	79 x 10 ⁵
Monobutirina 43	1:100	7	75 x 10 ⁴	35 x 10 ³	48 x 10 ⁴
Monobutirina 43	1:100	45	47 x 10 ⁴	8 x 10 ²	87 x 10 ³

Nota: La monopropionina 43 se compone de:

43 % de monoglicéridos de ácido propiónico
6 % de diglicéridos de ácido propiónico
1 % de triglicéridos de ácido propiónico
50 % glicerol

Nota: La monobutirina 43 se compone de:

43 % de monoglicéridos de ácido butírico
6 % de diglicéridos de ácido butírico
1 % de triglicéridos de ácido butírico
50 % glicerol

20 **[0025]** La Tabla 2 compara la acción antibacteriana in vitro de ácido butírico puro, de monoglicéridos de ácido butírico sin glicerol libre y de una mezcla de monoglicéridos de ácido butírico con glicerol libre, contra Clostridium

ES 2 557 288 T3

perfringens. Considerando que la mezcla de monoglicéridos de ácido butírico y glicerol ya exhibe una potencia inhibidora (es decir, no hay crecimiento) en los tres duplicados a una concentración de 1.000 ppm, los monoglicéridos de ácido butírico no presentan ninguna potencia inhibidora frente a la bacteria, y el ácido butírico solamente exhibe acción inhibidora acción a partir de 3.000 ppm.

5

TABLA 2

Bacterias: Clostridium perfringens CP27					
Concentración de inoculación: 10 ⁵					
Medio: Infusión de cerebro corazón					
Tiempo de incubación y aparición de crecimiento; + para 24 h, ++ para 37 h y +++ para 96 h – 3 replicaciones para cada concentración					
Control negativo	Control positivo (CP)				
		ppm	Ácido butírico	Monobutirina 43	Monoglicéridos de ácido butírico
	+	500	+	+	+
	+		+	+	+
	++		+	+	+
		media			
		1000	+	ausencia de crecimiento	+
			+	ausencia de crecimiento	+
			+	ausencia de crecimiento	+
		media			
		1500	+	ausencia de crecimiento	+
			+	ausencia de crecimiento	+
			+	ausencia de crecimiento	+
		media			
	2000	2000	++	ausencia de crecimiento	+
			++	ausencia de crecimiento	+
		++	++	ausencia de crecimiento	+
		media			
		2500	++	ausencia de crecimiento	+
			++	ausencia de crecimiento	+
			++	ausencia de crecimiento	+
		media			
		3000	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	+
			ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	+
			ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	+
		media			
	4000	4000	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	+

Bacterias: Clostridium perfringens CP27					
Concentración de inoculación: 10 ⁵					
Medio: Infusión de cerebro corazón					
Tiempo de incubación y aparición de crecimiento; + para 24 h, ++ para 37 h y +++ para 96 h – 3 replicaciones para cada concentración					
Control negativo	Control positivo (CP)	ppm	Ácido butírico	Monobutirina 43	Monoglicéridos de ácido butírico
			ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	+
			ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	+
		media			

5 **[0026]** La Tabla 3 compara la acción antibacteriana in vitro de ácido acético puro, de monoglicéridos de ácido acético sin glicerol libre y de una mezcla de monoglicéridos de ácido acético con glicerol libre, contra *Salmonella typhimurium* porcina. Considerando que la mezcla de monoglicéridos de ácido acético y glicerol (monoacetina 42) exhibe una potencia inhibidora (es decir, no hay crecimiento) en los tres duplicados a una concentración de 10.000 ppm, los monoglicéridos de ácido acético presentan potencia inhibidora frente a la bacteria a partir de 25.000 ppm y el ácido acético exhibe acción inhibidora acción a partir de 20.000 ppm.

TABLA 3

Bacterias: <i>Salmonella typhimurium</i> porcina					
Concentración de inoculación: 10 ⁵					
Medio: Infusión de cerebro corazón					
Tiempo de incubación y aparición de crecimiento: + para 24 h, ++ para 37 h y +++ para 96 h – 3 replicaciones para cada concentración					
pH 6					
Control negativo	Control positivo (CP)	ppm	Ácido acético	Monoacetina 42	Monoglicéridos de ácido acético
	+	5000	+	+	+
	+		+	+	+
	++		+	+	+
		Media			
		10000	+	ausencia de crecimiento	+
			+	ausencia de crecimiento	+
			+	ausencia de crecimiento	+
		Media			
		15000	+	ausencia de crecimiento	+
			+	ausencia de crecimiento	+
			+	ausencia de crecimiento	+
		Media			
		20000	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	+
		ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	+
			ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	+
		Media			

Bacterias: <i>Salmonella typhimurium</i> porcina					
Concentración de inoculación: 10 ⁵					
Medio: Infusión de cerebro corazón					
Tiempo de incubación y aparición de crecimiento: + para 24 h, ++ para 37 h y +++ para 96 h – 3 replicaciones para cada concentración					
pH 6					
Control negativo	Control positivo (CP)				
		ppm	Ácido acético	Monoacetina 42	Monoglicéridos de ácido acético
		25000	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento
			ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento
			ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento
		Media			
		30000	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento
			ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento
			ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento
		Media			
		40000	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento
			ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento
			ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento
		Media			
Nota: La monoacetina 42 se compone de: 42 % de monoglicéridos de ácido acético 7 % de diglicéridos de ácido acético 1 % de triglicéridos de ácido acético 50 % de glicerol					

5 [0027] La Tabla 4 compara la acción antibacteriana in vitro de ácido fórmico puro, de monoglicéridos de ácido fórmico sin glicerol libre y de una mezcla de monoglicéridos de ácido fórmico con glicerol libre, contra *Salmonella typhimurium* porcina. Considerando que la mezcla de monoglicéridos de ácido fórmico y glicerol (monoformina 42) exhibe una potencia inhibidora (es decir, no hay crecimiento) en los tres duplicados a una concentración de 5.000 ppm, los monoglicéridos de ácido fórmico presentan potencia inhibidora frente a la bacteria a partir de 25.000 ppm y el ácido fórmico exhibe acción inhibidora acción a partir de 15.000 ppm.

ES 2 557 288 T3

TABLA 4

Bacterias: <i>Salmonella typhimurium</i> porcina					
Concentración de inoculación: 10 ⁵					
Medio: Infusión de cerebro corazón					
Tiempo de incubación y aparición de crecimiento: + para 24 h, ++ para 37 h y +++ para 96 h – 3 replicaciones para cada concentración					
pH 6					
Control negativo	Control positivo (CP)	ppm	Ácido fórmico	Monoformina 42	Monoglicéridos de ácido fórmico
+	+	5000	+	ausencia de crecimiento	+
+	+		+	ausencia de crecimiento	+
	++		+	ausencia de crecimiento	+
		Media			
		10000	+	ausencia de crecimiento	+
			+	ausencia de crecimiento	+
			+	ausencia de crecimiento	+
		Media			
		15000	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	+
			ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	+
			ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	+
		Media			
	20000	20000	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	+
			ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	+
			ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	+
		Media			
		25000	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento
			ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento
			ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento
		Media			
		30000	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento
			ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento
			ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento
		Media			
		40000	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento

Bacterias: <i>Salmonella typhimurium</i> porcina					
Concentración de inoculación: 10 ⁵					
Medio: Infusión de cerebro corazón					
Tiempo de incubación y aparición de crecimiento: + para 24 h, ++ para 37 h y +++ para 96 h – 3 replicaciones para cada concentración					
pH 6					
Control negativo	Control positivo (CP)				
		ppm	Ácido fórmico	Monoformina 42	Monoglicéridos de ácido fórmico
			ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento
			ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento
		Media			
Nota: La monoformina 42 se compone de: 42 % de monoglicéridos de ácido fórmico 7 % de diglicéridos de ácido fórmico 1 % de triglicéridos de ácido fórmico 50 % de glicerol					

- 5 **[0028]** La Tabla 5 compara la acción antibacteriana in vitro de ácido fumárico puro, de monoglicéridos de ácido fumárico sin glicerol libre y de una mezcla de monoglicéridos de ácido fumárico con glicerol libre (Monofumarina 41) contra *E. coli*. Considerando que la mezcla de monoglicéridos de ácido fumárico y glicerol (monoformina 42) exhibe una potencia inhibitora (es decir, no hay crecimiento) en los tres duplicados a una concentración de 20.000 ppm, los monoglicéridos de ácido fumárico presentan potencia inhibitora frente a la bacteria a partir de 60.000 ppm y el ácido fumárico exhibe acción inhibitora a partir de 90.000 ppm.

TABLA 5

Bacterias: <i>E. coli</i>					
Concentración de inoculación: 10 ⁵					
Medio: Infusión de cerebro corazón					
Tiempo de incubación y aparición de crecimiento: + para 24 h, ++ para 37 h y +++ para 96 h – 3 replicaciones para cada concentración					
pH 5					
Control negativo	Control positivo (CP)				
		ppm	Ácido fumárico	Monofumarina 41	Monoglicéridos de ácido fumárico
	+	10000	+	+	+
	+		+	+	+
	++		+	+	+
		Media			
	20000	20000	+	ausencia de crecimiento	+
			+	ausencia de crecimiento	+
			+	ausencia de crecimiento	+
		Media			
		40000	+	ausencia de crecimiento	+
			+	ausencia de crecimiento	+
			+	ausencia de crecimiento	+
		Media			

Bacterias: E. coli					
Concentración de inoculación: 10 ⁵					
Medio: Infusión de cerebro corazón					
Tiempo de incubación y aparición de crecimiento: + para 24 h, ++ para 37 h y +++ para 96 h – 3 replicaciones para cada concentración					
pH 5					
Control negativo	Control positivo (CP)	ppm	Ácido fumárico	Monofumarina 41	Monoglicéridos de ácido fumárico
		60000	++	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento
			++	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento
			++	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento
		Media			
	80000	80000	++	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento
			++	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento
			++	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento
		Media			
		90000	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento
			ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento
			ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento
		Media			
		100000	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento
			ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento
			ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento	ausencia de crecimiento
		Media			
<p>Nota: La monofumarina 41 se compone de: 41 % de monoglicéridos de ácido fumárico 8 % de diglicéridos de ácido fumárico 1 % de triglicéridos de ácido fumárico 50 % de glicerol</p>					

5 **[0029]** Si se prefiere, las composiciones de la invención también pueden contener principios activos de aceites esenciales (aldehído cinámico, timol, carvacrol) en porcentajes comprendidos entre 1 y 20 % (calculado en peso sobre el peso de la mezcla de otros componentes) como habitualmente se proporciona para tales productos para alimentación de animales, puesto que estos principios activos son solubles en lípidos pero insolubles en glicerol.

10 **[0030]** Cabe señalar que cuando la composición de la invención se dispersa en agua, el glicerol rodea al propio monoglicérido para formar gotas que incorporan dicho monoglicérido, permaneciendo en suspensión en agua (los otros principios activos añadidos opcionalmente se disuelven en el monoglicérido y también se incorporan dentro de la gota de glicerol) (véase la figura 1).

15 **[0031]** Las composiciones de la invención pueden prepararse de acuerdo con los procesos de esterificación de ácidos grasos habituales ampliamente descritos en la literatura, pero utilizando un gran exceso de glicerol (nunca menos de 200 % en peso sobre el peso de los ácidos grasos utilizados) para obtener una gran cantidad de monoglicéridos con grandes cantidades de glicerol libre.

[0032] Las composiciones de la invención pueden añadirse a la alimentación animal y / o a su agua de bebida en cantidades de 0,1 a 1,5 %, preferentemente de 0,3-0,6 % en peso calculado en peso del alimento o la bebida.

5 [0033] Las composiciones de la invención están particularmente indicadas para la dieta de cerdos, pollos, peces, ganado vacuno, ovejas y animales de compañía.

Ejemplo 1

10 [0034] La reacción de esterificación se lleva a cabo en lotes de 10.000 kg.

[0035] En un reactor se introducen 3.000 kg de ácido butírico y 7.000 kg de glicerol a temperatura ambiente.

15 [0036] La temperatura se aumenta a 140 °C, el ácido butírico que se evapora se recicla dentro del reactor por medio de un condensador de reflujo.

[0037] La elevación posterior de la temperatura desde 140 a 170 °C debe ser muy lenta (durante aproximadamente 4 horas) y la temperatura del condensador de reflujo debe mantenerse a 120 °C con el fin de evaporar el agua derivada de la reacción de esterificación, mientras que el ácido butírico sigue reciclándose dentro del reactor.

20 [0038] En este punto, la temperatura se puede elevar a 180 °C (pero dejando la temperatura del condensador reflujo a 120 °C) y una vez se ha alcanzado esta temperatura se espera que la acidez de la mezcla alcance un valor de menos de 1 %.

25 [0039] Después se aplica un vacío para eliminar por destilación cualquier ácido butírico sin reaccionar hasta que se alcance una acidez final de menos de 0,2 %.

[0040] La mezcla se descarga a través de un refrigerador para llevarla a la temperatura ambiente.

30 [0041] De este modo se obtiene una mezcla que contiene 43 % de éster de monoglicérido, 6 % de éster de diglicérido, 1 % de éster de triglicérido y 50 % de glicerol.

35 [0042] Una vez que la reacción de esterificación se completa, el glicerol puede separarse si se desea mediante destilación de los ésteres de mono, di y triglicéridos obtenidos de este modo para llegar a una concentración de monoglicérido del 90 %.

Ejemplo 2

40 [0043] Sesenta lechones DanBred de 5 semanas de edad fueron asignados a dos grupos de treinta lechones cada uno: A) – control, y B) tratados, divididos en 6 jaulas de diez animales cada una. Después de los primeros 10 días de adaptación en los recintos, se inoculó a todos los animales por vía oral *Salmonella typhimurium*, aislada en el Instituto Zooprofilattico de Forli (Italia) a partir de muestras fecales de cerdos infectados, con una dosis igual a 7×10^7 ufc.

45 [0044] Al día siguiente, algunos de los sujetos de cada jaula presentaron diarrea. Los síntomas empeoraron y afectaron a todos los sujetos en los tres días siguientes tras la infección.

50 [0045] Se recogieron muestras fecales el tercer día después de la infección; se encontró que el recuento de bacterias era igual a 165.000 ufc en el grupo control A) y 160.000 ufc en el grupo tratado B). El grupo B) del tercer día después de la infección se trató con una mezcla compuesta por:

- Monoglicéridos de ácido butírico = 45 %
- Diglicéridos de ácido butírico = 6 %
- Triglicéridos de ácido butírico = 1 %
- 55 - Glicerol = 48 %

administrada en el agua de bebida a una dosis de 0,5 % durante tres días. El tercer día después del tratamiento, las muestras fecales se recogieron de nuevo para análisis de recuento de bacterias. El grupo de control A) presentó un número medio de ufc de 160.000, mientras que en el grupo tratado B) el número de ufc fue de 900. El uso de la mezcla de "ésteres de ácido butírico y glicerol" en los porcentajes indicados redujo las ufc de Salmonella en 3 log10, una administración de 3 días. Este hecho confirma la eficacia bactericida de la mezcla.

Ejemplo 3

65 [0046] El presente ensayo de campo se llevó a cabo en una granja italiana con problemas de higiene tales como ileítis muy evidente causada por una infección por *Lawsonia intracellularis*, enteritis por *Brachyspira* Spp y enteritis

necrótica causada por una infección por *Treponema hyodysenteriae*. 1.027 cerdos DanBred con un peso de aproximadamente 25 kg (de 71 días de edad) se dividieron en dos grupos: grupo control A) y grupo tratado B), compuestos por 511 y 516 animales, respectivamente.

5 **[0047]** Los dos grupos fueron alimentados con un pienso formulado de forma idéntica a excepción de los siguientes componentes: el pienso del grupo de control tenía lincomicina añadida, 200 ppm, y doxiciclina, 250 ppm, durante los primeros 14 días del ensayo, y solo lincomicina durante el tiempo restante. El grupo B) tratado no recibió antibióticos en la alimentación, solo una mezcla de "ésteres de ácido butírico y glicerol" compuesta de la siguiente manera:

10

- Monoglicéridos de ácido butírico = 45 %
- Diglicéridos de ácido butírico = 6 %
- Triglicéridos de ácido butírico = 1 %
- Glicerol = 48 %

15

administrada en la alimentación en una cantidad de 0,5 % para sustituir el 0,5 % de aceite de soja. El ensayo duró 63 días. Los resultados de eficiencia de crecimiento y de la alimentación se resumen en la siguiente tabla.

Tabla

	Grupo A) – Control	Grupo B) – Ésteres de ácido butírico y glicerol	Delta
Nº de animales	511	516	
Edad al inicio del ensayo (días)		71	
Edad al final del ensayo (días)	134	134	
Peso promedio al inicio del ensayo (kg)	25	25	
Peso promedio al final del ensayo (kg)	62,13	63,61	
Nº de animales muertos	5	2	-3
Nº de animales rechazados	3	2	-1
Aumento de peso promedio diario (kg)	0,59	0,61	+ 0,02
Pienso total consumido (kg)	53,570	53,250	-320
Carne producida en kg	19,340	20,200	+860
Índice de conversión del pienso	2,76	2,64	-0,12

20

[0048] Aunque el análisis fecal del grupo de control A) mostró la presencia de *Lawsonia*, su presencia no se encontró en el grupo tratado B). Los episodios de diarrea también fueron muy reducidos en el grupo tratado B). Los parámetros de crecimiento, el índice de conversión del pienso del grupo tratado B) fueron comparables, y con una tendencia mejor que en el grupo control A) cuya dieta contenía los antibióticos mencionados. La mezcla de "ésteres de ácido butírico y glicerol" permitió controlar las enfermedades indicadas, sin el uso de antibióticos. El ensayo ha demostrado el efecto antibacteriano de la mezcla de "ésteres de ácido butírico y glicerol" mezcla con la consiguiente mejora de la salud intestinal.

25

Ejemplo 4

30

Prueba de eficacia en *Salmonella typhimurium* en pollos

Cepa de Salmonella

35 **[0049]** Para la prueba se usó una cepa de *Salmonella typhimurium* aislada e identificada en la sección IZSLER de Forli.

Animales

40 **[0050]** Se utilizaron pollos SPF (libres de patógenos específicos), 30 animales por prueba. Los pollos se incubaron en la sección IZSLER de Forli. Los sujetos se introdujeron inmediatamente en unidades de aislamiento.

Dieta

45 **[0051]** Los animales recibieron agua de la red de suministro de agua y un pienso de iniciación comercial *ad libitum*. El pienso contenía monobutirina 43 añadida.

Protocolo experimental

5 [0052] Se prepararon 4 grupos de 30 sujetos cada uno. Las dietas diferían en la diferente cantidad de Monobutirina 43 añadida al pienso desde el primer día de vida, y se identificaron del siguiente modo: grupo control sin tratar: 0 %, grupo 1: 1 % en el pienso, grupo 2: 0,3 % en el pienso. El grupo 3 recibió el mismo pienso que el grupo control hasta el día 14 de vida, es decir, hasta el 7º día tras la infección y solo recibió pienso suplementado con 1,4 % de monobutirina 43 tras ese día.

10 [0053] En mayores de 7 días, todos los sujetos fueron infectados por vía esofágica con 10⁷ ufc de Salmonella typhimurium. 24 horas después de la infección, se tomaron hisopos de la cloaca de todos los sujetos para confirmar que la infección por Salmonella typhimurium había arraigado. A los 14, 24 y 35 días de vida, se sacrificó a 10 sujetos en cada grupo. Se recolectaron los ciegos de cada animal y se determinó la carga de Salmonella typhimurium (expresada en ufc / g).

15 Pruebas de laboratorio

20 [0054] La ausencia de anticuerpos contra S. typhimurium se confirmó con una prueba de ELISA. Los hisopos cloacales se sembraron directamente sobre agar entérico Hektoen y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Un gramo del contenido intestinal se diluyó en 9 ml de lactato de Ringer y se sembró en agar entérico Hektoen (volumen del inóculo: 0,1 ml). El recuento de colonias se llevó a cabo después de 24 horas de incubación a 37 °C. Para cada colección, se calcularon las medias geométricas de las cargas bacterianas de los 10 sujetos sacrificados.

25 [0055] Se encontró que todos los sujetos, después de un día de vida, eran seronegativos para Salmonella typhimurium. 24 horas después de la infección, se encontró que todos los hisopos cloacales eran positivos para S. typhimurium. Los resultados de las cargas bacterianas de los ciegos determinadas se muestran en la siguiente tabla.

Tabla

UFC en el ciego de pollos infectados con Salmonella Typhimurium – 10 ⁷				
	Control	Grupo 1 (1 % en el pienso)	Grupo 2 (0,3 % en el pienso)	Grupo 3 (1,4 % en el pienso desde el día 14 de vida)
Día de la infección (séptimo día de vida)	0	0	0	0
Séptimo día después de la infección	6.400.000	770.000	2.226.000	6.302.000 Inicio del tratamiento
17 día después de la infección	25.120.000	213.220	1.242.000	171.120
28 día después de la infección	(alta mortalidad)	>100	300	1.000

30 **Ejemplo 5**

Pruebas de sensibilidad in vitro frente a hongos filamentosos (mohos)

Materiales y métodos

35 [0056] Para la prueba se usaron cepas de Aspergillus spp, Penicillium spp y Fusarium spp aisladas e identificadas durante la actividad diagnóstica en la sección IZSLER de Forlì de piensos completos usados en la industria avícola. Para preparar el inóculo, se recogió el micelio de cultivos puros de las cepas analizadas utilizando un hisopo. El material recogido de este modo se disolvió en un caldo de cultivo (BHI – infusión de cerebro corazón). Se introdujeron 5 ml de la suspensión fúngica y una cantidad igual del producto que se va a analizar en contacto en un tubo de ensayo. El tubo de ensayo se incubó a 20 ± 4 °C durante 24 horas.

40 [0057] Después de este período de tiempo, la suspensión fúngica se sembró y se enumeró. La suspensión control se obtuvo introduciendo en un tubo de ensayo 5 ml de suspensión de hongos + 5 ml de diluyente (lactato de Ringer). La lectura de las pruebas se llevó a cabo después de un período de incubación de 5 días a 20 ± 4 °C.

45 [0058] Los resultados proporcionados en siguiente tabla se expresan como ufc / ml

Tabla

PRODUCTO	ASPERGILLUS spp.	PENICILLIUM spp.	FUSARIUM spp:
Control	450000	97000	310000
Monopropionina 43	20000	1500	90000
Monobutirina 43	1000	700	3000

PRODUCTO	ASPERGILLUS spp.	PENICILLIUM spp.	FUSARIUM spp:
Ácido propiónico	300	<100	300
Propionato amónico	1000	100	500
<p>Nota: La monopropionina 43 se compone de: 43 % de monoglicéridos de ácido propiónico 12 % de diglicéridos de ácido propiónico 1 % de triglicéridos de ácido propiónico 28 % de glicerol libre 16 % de H₂O</p> <p>Nota: La monobutirina 43 se compone de: 43 % de monoglicéridos de ácido butírico 6 % de diglicéridos de ácido butírico 1 % de triglicéridos de ácido butírico 50 % de glicerol</p>			

Ejemplo 6

Prueba de eficacia in vitro frente a *Penicillium* spp y *Fusarium* spp

5

Materiales y métodos

10 **[0059]** Cepas: para la prueba se usaron cepas de mohos aisladas e identificadas por la sección IZSLER en Forlì. Las cepas se revitalizaron en caldo BHI, después se enumeraron en agar OGYE (después de incubar a 20 °C durante 5 días)

[0060] Sustrato: se usó un pienso completo para pollos, esterilizado en un horno seco a 100 °C durante 4 horas.

15 **[0061]** Prueba de eficacia: en 10 g de pienso se inocularon 2 ml de suspensión fúngica (en agua destilada) a la que se añadieron 70 µl del producto que se iba a analizar. La mezcla así obtenida se mantuvo a temperatura ambiente. También se prepararon un control positivo (infectados y no tratados) y un control negativo (solo pienso + agua destilada). Los días 7 y 14 después de la infección, se evaluaron las concentraciones de hongos en las muestras tratadas y las muestras control.

20 **[0062]** Los resultados se proporcionan en la siguiente tabla.

TABLA

PRODUCTO	Concentración de Fusarium spp. el día 0 (ufc / g)	Concentración de Fusarium spp. 7 días después de la infección (ufc / g)	Concentración de Fusarium spp. 14 días después de la infección (ufc / g)	Concentración de Penicillium spp. el día 0 (ufc / g)	Concentración de Penicillium spp. 7 días después de la infección (ufc / g)	Concentración de Penicillium spp. 14 días después de la infección (ufc / g)
Control positivo	5.700.000	72.000.000	300.000.000	100.000	30.000.000	200.000.000
Control negativo	<100	<100	<100	<100	<100	<100
Monopropionina 43	5.700.000	410.000	250.000	100.000	<100	<100

Nota: La monopropionina 43 se compone de:
 43 % de monoglicéridos de ácido propiónico
 12 % de diglicéridos de ácido propiónico
 1 % de triglicéridos de ácido propiónico
 28 % de glicerol libre
 16 % de H₂O

REIVINDICACIONES

5 **1.** Composiciones que contienen monoglicéridos de ácido orgánico de C₁ a C₇ en porcentajes 10 % y 90 % en peso calculados sobre el peso total de la composición para su uso como composiciones antibacterianas y anti-moho para el tratamiento de animales **caracterizadas por que** dicha composición contiene glicerol en porcentajes entre 10 % y 90 % en peso calculados sobre el peso total de la composición.

10 **2.** Composiciones según la reivindicación 1, en las que dichas composiciones contienen monoglicéridos de ácido orgánico de C₁ a C₇ en porcentajes entre 40 %–90 % y glicerol en porcentajes entre 10 %–60 % en peso calculados sobre el peso total de la composición.

3. Composiciones según las reivindicaciones 1 y 2, en las que dichos ácidos orgánicos se eligen de: ácidos fórmico, acético, propiónico, láctico, butírico, cítrico, fumárico y benzoico.

15 **4.** Composiciones según la reivindicación 3, en las que dichos ácidos son ácido butírico y ácido propiónico.

5. Composiciones según las reivindicaciones 1 – 4 que consisten en:

(a)

éster monoglicérido de ácido butírico	42 – 47 %
éster diglicérido de ácido butírico	5 – 8 %
éster triglicérido de ácido butírico	0,5 – 2 %
glicerol	45 – 50 %

20

o
(b)

éster monoglicérido de ácido propiónico	45 – 50 %
éster diglicérido de ácido propiónico	8 – 12 %
éster triglicérido de ácido propiónico	1 – 3 %
glicerol	36 – 40 %

25

o
(c)

éster monoglicérido de ácido butírico	45 %
éster diglicérido de ácido butírico	6 %
éster triglicérido de ácido butírico	1 %
glicerol	48 %

o
(d)

monoglicéridos de ácido butírico	43 %
diglicéridos de ácido butírico	6 %
triglicéridos de ácido butírico	1 %
glicerol	50 %

30

o
(e)

éster monoglicérido de ácido propiónico	49 %
éster diglicérido de ácido propiónico	10 %
éster triglicérido de ácido propiónico	2 %
glicerol	39 %

o
(f)

monoglicéridos de ácido propiónico	43 %
diglicéridos de ácido propiónico	6 %
triglicéridos de ácido propiónico	1 %
glicerol	50 %

35

en las que dichos porcentajes se expresan en peso.

40 **6.** Composiciones según las reivindicaciones 1 – 5 que también contienen principios activos de aceites esenciales en porcentajes comprendidos entre 1 – 20 % (en peso).

7. Uso de composiciones según las reivindicaciones 1 – 6 como composiciones antibacterianas y anti-moho para el tratamiento de cereales, piensos y productos alimentarios en general y el agua de bebida destinados a la

alimentación de los animales.

5 **8.** Piensos o bebidas para animales, líquidos o sólidos, que comprenden una composición que contiene monoglicéridos de ácido orgánico de C₁ a C₇ en porcentajes 10 % y 90 % en peso calculados sobre el peso total de la composición para su uso como composiciones antibacterianas y anti-moho para el tratamiento de animales **caracterizados por que** dicha composición contiene glicerol en porcentajes entre 10 % y 90 % en peso calculados sobre el peso total de la composición.

10 **9.** Piensos o bebidas según la reivindicación 8, en los que dichas composiciones se añaden en una cantidad entre 0,1 y 1,5 %, preferentemente entre 0,3 y 0,5 % en peso sobre el peso total del pienso o la bebida.

10. Piensos según las reivindicaciones 8 y 9, en los que dichos piensos son los usados para la alimentación de cerdos, pollos, peces, ganado vacuno, ovejas y animales de compañía.

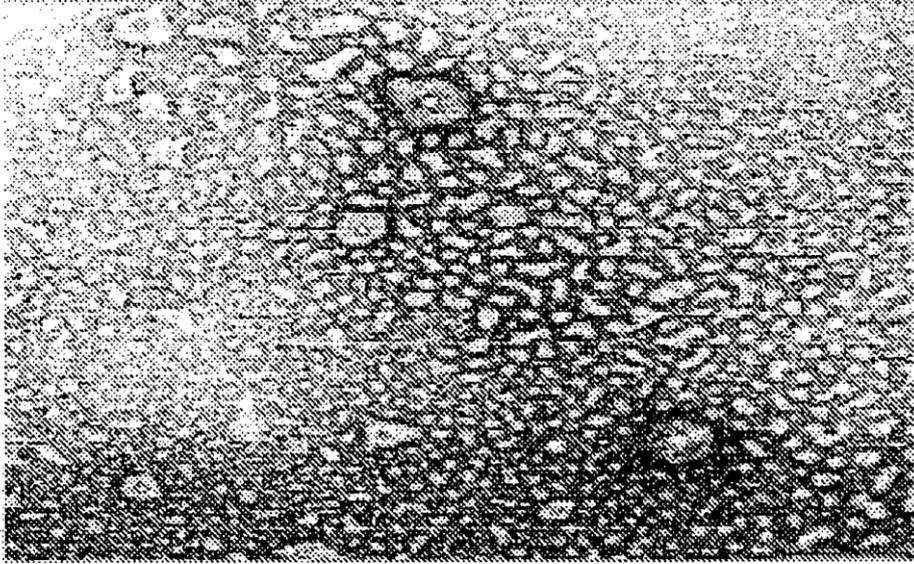


FIG. 1



FIG. 2



FIG. 3