

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 469**

51 Int. Cl.:

A23K 20/158 (2006.01)

A23K 50/70 (2006.01)

A23K 50/75 (2006.01)

A23K 50/30 (2006.01)

A23K 50/80 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.01.2010 PCT/NL2010/050033**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.07.2010 WO10085149**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2010 E 10702358 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017 EP 2381797**

54 Título: **Aditivo para pienso de animales y pienso para animales que comprende esteres de alquilo de ácidos grasos de cadena media, y su uso en pienso para animales**

30 Prioridad:

23.01.2009 EP 09151285

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

19.07.2017

73 Titular/es:

**NUTRECO NEDERLAND B.V. (100.0%)
Veerstraat 38
5831 JN Boxmeer**

72 Inventor/es:

**HAN, YANMING;
SMITS, COENRAAD HENRICUS MARIA;
BRENNAN, JOHN;
PAGE, GREGORY IAN y
VAN DAM, JOHANNES TEUNIS PIETER**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 625 469 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

Aditivo para pienso de animales y pienso para animales que comprende ésteres de alquilo de ácidos grasos de cadena media, y su uso en pienso para animales

5 La invención está dirigida a un pienso para animales y un procedimiento para aumentar la eficiencia del pienso y la salud en animales de granja, incluidos mamíferos, aves y peces.

10 El uso de ácidos grasos como agentes antimicrobianos para inhibir el crecimiento de microbios nocivos en organismos vivos se conoce desde hace mucho tiempo en la documentación, véase p. ej., el documento US-A-2 466 663. Actualmente se utiliza ampliamente una mezcla de ácidos grasos de cadena media (AGCM) y ácidos orgánicos para inhibir el crecimiento de patógenos en el tracto gastrointestinal de animales. La presencia de una mezcla de este tipo en el pienso para animales da como resultado una composición favorable de la microbiota gastrointestinal y una mejorada eficiencia del pienso en animales.

15 El documento EP-A-1 059 041 describe una composición de suplemento de la alimentación que comprende al menos un triglicérido que contiene AGCM y al menos una enzima lipolítica exógena. La adición de este suplemento al pienso para animales da como resultado un entorno fisiológico en el tracto gastrointestinal del animal, incluyendo su estómago, que regula y estabiliza la microbiota intestinal y, en consecuencia, da como resultado una mejora del crecimiento en el animal.

20 El documento WO-A-01/97799 describe el uso en composiciones de alimentación de uno o más ácidos grasos de cadena media C6-C10, sales, derivados o mezclas de los mismos para la inhibición de la contaminación microbiana. Sin embargo, no se menciona el uso específico y la eficacia de ésteres de alquilo de los AGCM como agentes antimicrobianos.

25 El documento US-A-4 526 798 describe una mezcla que comprende el éster etílico de ácido 2-hidroxi-4-metilpentanoico, cuya mezcla se puede usar en sabores que mejoran el aroma o gusto de los alimentos con sabores tropicales. La concentración de la mezcla en tales aromas oscila entre 0,75 % y 1,2 % en peso del sabor. La dosificación resultante del éster etílico en el alimento es baja, por ejemplo 3-8 ppm. El efecto de la mezcla como agente antimicrobiano no se describe en este documento.

El documento W0-2006/00297 describe el uso de los MFCA, sus derivados o mezclas para inhibir el crecimiento y/o para reducir la cantidad de patógenos microbianos. Este documento tampoco menciona específicamente ésteres de alquilo de los AGCM y su eficacia como inhibidor de patógenos microbianos.

30 El documento WO-A-01/52837 describe el uso de un éster graso para preparar una composición diseñada para inhibir la actividad de 5- α -reductasa en farmacología, dermatología, cosméticos y como aditivo alimentario.

Karbara J. J., American Oil Chemist's Society, páginas 1-14, 1 de enero de 1978, describe una revisión de ácidos grasos y derivados como agentes antimicrobianos. Sin embargo, no menciona específicamente ésteres de alquilo de los AGCM y su eficacia como agente antimicrobiano.

35 Karbara J. J., American Oil Chemist's Society, páginas 15-24, 1 de enero de 1978, describe los efectos combinados sobre la actividad antibacteriana de ácidos grasos y sus ésteres con congelación o calentamiento y la adición de productos químicos tales como ácido cítrico contra bacterias gramnegativas. Además, esta revisión sólo discute monoglicéridos de los AGCM y no ésteres de alquilo de los AGCM.

40 Una desventaja de los AGCM y derivados en el pienso para animales de la técnica anterior es que son rápidamente absorbidos *in vivo* en el tracto intestinal delgado proximal. En consecuencia, no son capaces de ejercer propiedades moduladoras de la microbiota en el intestino delgado distal y en el intestino posterior.

Otras desventajas de los AGCM son su corrosividad, su olor irritante y su mal sabor. Los ésteres de etilo y los ésteres de metilo no son corrosivos, pero los ésteres basados en los AGCM de cadena más corta tienen normalmente una baja temperatura de inflamación.

45 Otra desventaja es que en muchos casos los AGCM mostraban menos actividad patógena que sus equivalentes de éster porque los ésteres poseen actividad inespecífica de un agente de superficie (tensioactivo). Los estudios han demostrado que las actividades antibacterianas, antifúngicas y antivíricas de los ésteres se debieron a sus funciones en la alteración de las membranas celulares, véase K. Nihei et al., J. Agric. Food Chem., 52 (2004), 5011-5020.

50 El objeto de la presente invención es proporcionar un pienso para animales que tenga fuertes propiedades antimicrobianas y antipatógenas y dé como resultado una composición favorable de la microbiota gastrointestinal y una eficiencia del pienso mejorada en animales alimentados con dicho pienso para animales, y que supere al menos en parte una o más de las desventajas antes mencionadas de la técnica anterior.

En un primer aspecto, este objeto se satisface proporcionando un pienso para animales adecuado para alimentar mamíferos, aves y peces, que comprende un éster de alquilo de un ácido graso, en donde dicho ácido graso tiene una longitud de cadena de 5 a 12 átomos de carbono, y en donde la dosificación de dicho éster en dicho pienso para

animales es de 50 ppm en peso o superior, basado en el peso total de dicho pienso para animales, para uso en la disminución del riesgo de infecciones microbianas en un animal.

En la presente solicitud, con un ácido graso de cadena media (AGCM) se entiende un ácido graso que tiene una longitud de cadena de 5-12 átomos de carbono, es decir, que tiene una cadena continua más larga de 5-12 átomos de carbono. Preferiblemente, el pienso para animales de la invención comprende un AGCM que tiene una longitud de cadena de 8-12 átomos de carbono. No es deseable una longitud de cadena mayor de 12 átomos de carbono, porque esto tendrá una influencia negativa en el grado de hidrólisis del éster. En la presente solicitud, un AGCM que tiene una longitud de cadena de x a veces se denomina C x . Por ejemplo, el ácido octanoico puede denominarse C8.

Los autores de la invención encontraron que los ésteres de los AGCM mostraban una mayor actividad antimicrobiana que los AGCM y, por lo tanto, proporcionan más fuertes propiedades de modulación de la microbiota dentro del intestino en comparación con los AGCM.

Además, los autores de la invención descubrieron sorprendentemente que las formas esterificadas de AGCM según la invención tienen una actividad prolongada en el tracto gastrointestinal en comparación con las formas no esterificadas de AGCM. Además, se encontró que los ésteres de alquilo de los AGCM según la presente invención son aún más antimicrobianos que sus equivalentes no esterificados. Otra ventaja del pienso para animales de la presente invención es que los ésteres de alquilo de los AGCM son todavía relativamente baratos, aunque son más caros que los AGCM simples (C8, C10 y/o C12).

El alquilo en el éster en el pienso para animales de la invención es preferiblemente metilo, etilo, propilo, butilo o una combinación de los mismos.

El AGCM en el éster en el pienso para animales de la invención es preferiblemente ácido octanoico, ácido decanoico, ácido dodecanoico o una combinación de los mismos.

El éster de alquilo de AGCM en el pienso para animales de la invención es preferiblemente octanoato de metilo, decanoato de metilo, dodecanoato de metilo, octanoato de etilo, decanoato de etilo, dodecanoato de etilo, octanoato de propilo, decanoato de propilo, dodecanoato de propilo, octanoato de butilo, decanoato de butilo, dodecanoato de butilo o una combinación de los mismos.

La dosificación del éster de alquilo de AGCM en el pienso para animales de la invención es preferiblemente 50 ppm en peso o superior, más preferiblemente 100 ppm en peso o superior, más preferiblemente 200 ppm en peso o superior, basado en el peso total del pienso para animales. Una dosis menor que 50 ppm en peso puede dar como resultado un efecto antimicrobiano insuficiente. La dosificación del éster de alquilo de AGCM en el pienso para animales de la invención debe ser preferiblemente menor que 5.000 ppm en peso, preferiblemente menor que 1.000 ppm en peso, más preferiblemente menor que 500 ppm en peso, basado en el peso total del pienso para animales. Una desventaja de usar dosificaciones superiores a 5.000 ppm en peso es que dichas dosificaciones pueden tener un efecto no deseado sobre el equilibrio microbiótico. Una desventaja adicional de usar dosis altas es el alto precio de coste resultante.

El tracto gastrointestinal comprende el estómago, que tiene un pH de 3-4, el intestino grueso, que tiene un pH de 6-7, y el intestino delgado, que tiene un pH de aproximadamente 7. Microorganismos, tanto microorganismos patógenos como neutros o beneficiosos, están en particular presentes en el intestino grueso y en el intestino delgado.

Sin desear estar limitado por la teoría, se cree que la absorción de los AGCM se retrasa por la forma esterificada según la presente invención. De este modo, la forma bioactiva de ésteres de alquilo de AGCM podrá expresar su bioactividad en cuanto al tracto distal del intestino delgado, p. ej., el extremo distal del intestino delgado, que es crucial para la modulación de la microbiota local, dando como resultado una mejorada eficiencia de la utilización de nutrientes (eficiencia de la alimentación). El índice de transformación (IT) del alimento es una medida de la eficiencia de un animal para transformar la masa del alimento en un aumento de la masa corporal y puede definirse como la masa del alimento ingerido dividido por la ganancia de masa corporal, durante todo un período de tiempo especificado. La capacidad de los ésteres de alquilo de AGCM para expresar su bioactividad en el intestino delgado puede también ser beneficiosa para el control de importantes patógenos entéricos potenciales que se encuentran principalmente en el tracto intestinal distal. Ejemplos de tales patógenos son *Clostridium perfringens*, *Streptococcus suis*, *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*

Los microorganismos se pueden dividir en microorganismos gramnegativos y grampositivos. Un ejemplo de microorganismos gramnegativos es la *Escherichia coli*, que es el agente causante de la diarrea en cerdos. Un ejemplo de un microorganismo grampositivo es *Clostridium perfringens*, microorganismo que desempeña un papel importante en el desarrollo de *Necrotic Enteritis* en el intestino delgado de pollos de engorde.

El equilibrio en el tracto gastrointestinal es muy importante para la prevención y tratamiento de las infecciones entéricas en el organismo vivo. Por ejemplo, es importante para la salud de un organismo vivo que cada parte del tracto gastrointestinal tenga un cierto intervalo de pH y que haya una composición favorable de diferentes microorganismos presentes en cada parte del tracto gastrointestinal. El equilibrio en el tracto gastrointestinal puede

ser afectado por la adición de aditivos al pienso para animales.

Los ésteres de alquilo de AGCM no tienen efecto significativo sobre el pH en los intestinos. Los ésteres de alquilo de AGCM actúan sobre la membrana de microorganismos tanto de microorganismos patógenos como neutros y beneficiosos, desactivando y/o destruyendo de este modo los microorganismos.

5 El pienso para animales según la presente invención funciona de dos maneras. En primer lugar, los patógenos son inhibidos por la propiedad antimicrobiana de los ésteres de alquilo de AGCM, disminuyendo así el riesgo de infecciones. Además, la disminución de la actividad microbiana de los microorganismos en general en el tracto gastrointestinal da como resultado una disminución del índice de transformación (IT) del alimento, que corresponde a una mejorada eficiencia del pienso en el animal.

10 Se encontró que los ésteres de alquilo de AGCM son particularmente adecuados para la inhibición de bacterias grampositivas, mientras que los ácidos orgánicos son particularmente adecuados para la inhibición de bacterias gramnegativas. El modo de acción sobre microbios de AGCM y de ácidos orgánicos difiere. Se encontró además que la combinación de ésteres de alquilo de AGCM y ácidos orgánicos puede tener un efecto sinérgico sobre la inhibición de microbios dañinos y sobre la disminución de la actividad microbiana en general. Los ésteres de alquilo de AGCM, en particular ésteres de etilo de AGCM, alteran las propiedades de barrera de la membrana del microbio, potenciando así el paso de ácidos orgánicos a la célula microbiana, lo que lleva a la inhibición de vías metabólicas esenciales. Por lo tanto, puede ser preferible añadir uno o más ácidos orgánicos al pienso para animales según la presente invención. Ejemplos de ácidos orgánicos preferidos son uno o más de ácido valérico (ácido pentanoico), ácido caprílico (ácido octanoico), ácido cáprico (ácido decanoico), ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido láctico, ácido butírico, ácido cítrico, ácido málico, ácido fumárico, ácido benzoico, ácido succínico, ácido sórbico, ácido tartárico o sales sódicas, potásicas, amónicas o cálcicas de los mismos.

15 Además, se puede añadir ácido gálico o un éster de alquilo de ácido gálico al pienso para animales según la invención. El ácido gálico y el éster de alquilo del ácido gálico también tienen propiedades antimicrobianas. Se encontró que el pienso para animales que comprende un éster de alquilo de AGCM en combinación con ácido gálico y/o un éster de alquilo de ácido gálico tiene un efecto sinérgico sobre las propiedades antimicrobianas de estas moléculas en el tracto gastrointestinal, mejorando así significativamente la bioactividad de estas moléculas. Ejemplos de ésteres de alquilo de ácido gálico particularmente preferidos que se pueden añadir al pienso para animales de la invención son galato de propilo, galato de pentilo, galato de octilo y galato de laurilo.

25 El pienso para animales según la invención es adecuado para todos los animales, incluidos mamíferos, peces y aves. Es particularmente adecuado para animales que tienen un único estómago, por ejemplo para cerdos o aves de corral.

30 La invención se refiere además a un ingrediente, premezcla o suplemento para un pienso para animales adecuado para alimentar mamíferos, aves y peces, que comprende un éster de alquilo de un ácido graso, en donde dicho ácido graso tiene una longitud de cadena de 5-12 átomos de carbono, y en donde la dosificación de dicho éster es 1 % en peso o superior. Dicho ingrediente, premezcla o suplemento puede comprender además uno o más de los siguientes aditivos: microingredientes, tales como vitaminas y elementos traza; AGCM; minerales y ácidos orgánicos.

35 La invención se refiere además a un procedimiento para aumentar la eficiencia de la alimentación en animales que comprende alimentar a un mamífero, ave o pez con el pienso para animales, ingrediente, premezcla o suplemento de la presente invención.

40 La invención también se refiere al uso de un éster de alquilo de AGCM o un éster de alquilo de producto enriquecido con AGCM en un suplemento alimenticio para la mejora de la eficiencia de la alimentación en un animal, en donde dicho AGCM tiene una longitud de cadena de 5-12 átomos de carbono y la dosificación de dicho éster en dicho pienso para animales es de 50 ppm en peso o superior, basado en el peso total de dicho pienso para animales, y en donde dicho uso no es terapéutico.

45 La invención se refiere también a un éster de alquilo de un ácido graso o éster de alquilo de un producto enriquecido en ácido graso para su uso en un pienso para animales para disminuir el riesgo de infecciones microbianas en un animal, en donde dicho ácido graso tiene una longitud de cadena de 5-12 átomos de carbono y la dosificación de dicho éster en dicho pienso para animales es de 50 ppm en peso o superior, basado en el peso total de dicho pienso para animales.

50 La invención se aclara a continuación basándose en algunos ejemplos, que no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1. Inhibición de *Clostridium perfringens* por diversos ésteres de metilo y etilo de ácidos grasos de cadena media.

55 Se utilizó un espectrofotómetro para medir el crecimiento de microorganismos en caldo a lo largo del tiempo (8

horas) mediante densidad óptica (DO) para caldos inoculados con cepas bacterianas específicas. La disminución relativa de la DO es una medida de la fuerza inhibidora. Los caldos se trataron con niveles escalonados de sustancias inhibidoras potenciales y se incubaron durante 24 horas.

5 Los tratamientos utilizados fueron los siguientes: octanoato de metilo; octanoato de etilo; decanoato de metilo; decanoato de etilo; y dodecanoato de etilo.

Los resultados se dan en la figura 1. De la figura 1 puede observarse que el dodecanoato de etilo muestra una inhibición completa en todos los niveles ensayados, mientras que el octanoato de metilo muestra casi los mismos resultados. Se puede concluir que, de todos los tratamientos utilizados, el dodecanoato de etilo es el inhibidor más eficaz contra *Clostridium perfringens*.

10 Ejemplo 2 Inhibición de *Clostridium perfringens* por ácido Láurico (C12) y su éster etílico (EL), sea o no en combinación con ácido octanoico/decanoico (C8/C10).

15 Se utilizó un espectrofotómetro para medir el crecimiento de microorganismos en caldo a lo largo del tiempo (8 horas) por medio de la densidad óptica de caldos inoculados con cepas bacterianas específicas. La disminución relativa de la DO es una medida de la fuerza inhibidora. Los caldos se tratan con niveles escalonados de sustancias inhibidoras potenciales y se incuban durante 24 horas.

Los tratamientos utilizados fueron los siguientes: dodecanoato de etilo (DE); ácido dodecanoico (C12); mezcla de ácido octanoico/decanoico (C8/C10); combinación de C8/C10 y DE (50/50); combinación de C8/C10 y C12 (50/50).

20 Los resultados se dan en la figura 2. A partir de la figura 2 se puede ver que el éster etílico del ácido dodecanoico demostraba la inhibición completa de *Clostridium perfringens* incluso en el nivel de inclusión más bajo del tratamiento mientras que el ácido dodecanoico no era tan eficaz como la eficacia a 67 ppm. La combinación de ácido octanoico/decanoico y dodecanoato de etilo también era eficaz para inhibir *Clostridium perfringens* en todos los niveles de tratamiento.

Por lo tanto, puede concluirse que el éster de etilo tiene una mayor fuerza inhibidora que el ácido graso libre, pero un efecto inhibidor comparable al de la combinación de ácido octanoico/decanoico y dodecanoato de etilo.

25 Ejemplo 3. Efecto de 1.000 ppm de dodecanoato de etilo o ácido dodecanoico en la alimentación de pollos de engorde en la recuperación en diversos segmentos del tracto gastrointestinal.

30 A los pollos de engorde se les administró pienso suplementado con 1.000 ppm de bien ácido dodecanoico o de dodecanoato de etilo durante todo el ensayo. Al día 43 de edad, se sacrificaron 12 aves por tratamiento, y el contenido de duodeno, yeyuno e íleon se recogió y se analizaron los niveles de dodecanoato de etilo y ácido dodecanoico. En la figura 3 se representan los niveles medios.

La Figura 3 muestra que el nivel del éster de etilo es más alto que el ácido graso libre en el yeyuno. Por lo tanto, puede concluirse que el éster de etilo no es tan rápidamente adsorbido, a través de la pared intestinal, como el ácido graso libre.

35 Ejemplo 4. Efecto de 1.000 ppm de dodecanoato de etilo o de ácido dodecanoico en la alimentación de pollos de engorde, inoculados con *Clostridium*, en los posteriores recuentos de *Clostridium* en el yeyuno.

40 Los pollos de engorde se alojaron en corrales de grupo y se les administró pienso suplementado con 1.000 ppm de dodecanoato de etilo o de ácido dodecanoico. Se realizaron ensayos paralelos, uno con aves normales y otro con aves que fueron inoculadas con 10^8 UFC de *Clostridium perfringens* en aves de 9 a 11 días. Al día 13 de edad, los recuentos de *Clostridium* se midieron en bolo alimenticio reciente tomado en el yeyuno (véase la tabla 1). Se encontró que el pienso suplementado con éster etílico de ácido dodecanoico llevaba a una reducción global significativa de los recuentos de *Clostridium*. El efecto fue mayor cuando los pollos de engorde fueron estresados por inoculación con *Clostridium*.

Tabla 1. Recuentos de *Clostridium perfringens* en el yeyuno de pollos de engorde infectados y normales al día 13 de edad.

| Modelo animal | Suplemento en la alimentación | | Nivel p |
|---------------|-------------------------------|--------------------|------------|
| | Forma libre C12 | Éster de etilo C12 | |
| No desafiado | 1,418 | 1,048 | $p = 0,15$ |
| Desafiado | 2,122 | 0,977 | $p = 0,24$ |
| Global | 1,770 | 1,013 | $p = 0,08$ |

Estos resultados demuestran que la suplementación con dodecanoato de etilo proporciona una inhibición más fuerte de *Clostridium perfringens* en el yeyuno que la suplementación con niveles iguales de ácido dodecanoico. Este efecto puede atribuirse más probablemente a los niveles residuales más altos de producto de degradación del dodecanoato de etilo (a saber, ácido dodecanoico) en el yeyuno (véase el ejemplo 3, figura 3).

- 5 Ejemplo 5. Efecto de 1.000 ppm de dodecanoato de etilo o de ácido dodecanoico en la alimentación de pollos de engorde, inoculados con *Clostridium*, sobre el crecimiento, la transformación del alimento y la mortalidad.

En pollos de engorde infectados en días 9-11 con *Clostridium perfringens*, se observó el aumento de peso, el índice de transformación del alimento y la mortalidad durante 6 semanas (42 días). La alimentación se suplementó con 1.000 ppm de dodecanoato de etilo o de ácido dodecanoico. Se observó una mejora global para todos los parámetros medidos en el grupo de dodecanoato de etilo (tabla 2) en comparación con el ácido graso libre.

Tabla 2: Crecimiento, transformación del alimento y mortalidad de pollos de engorde infectados con *Clostridium perfringens*

| Comportamiento 0-42 días | Ácido dodecanoico, 1.000 ppm | Dodecanoato de etilo, 1.000 ppm |
|---------------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| Aumento de peso, g/día | 63,78 | 65,5 |
| Ingestión de alimento, g/día | 104,3 | 106,5 |
| Índice de transformación del alimento | 1,636 | 1,626 |
| Mortalidad, % | 8,333 | 4,621 |

- 15 De la tabla 2 puede concluirse que el éster de etilo del ácido dodecanoico da como resultado un mejor comportamiento zootécnico que el propio ácido dodecanoico.

Ejemplo 6 Efecto de 1.000 ppm de dodecanoato de etilo o de ácido dodecanoico en la alimentación de lechones sobre el rendimiento zootécnico y la diarrea.

20 Se llevó a cabo una prueba en donde se ensayó el efecto de 1.000 ppm de ácido dodecanoico o de 1.000 ppm de dodecanoato de etilo sobre la alimentación de 108 lechones destetados alojados en corrales de grupo (n = 9 por tratamiento). El efecto sobre la puntuación media de diarrea (durante el período total) por tratamiento se muestra a continuación en la tabla 3:

Tabla 3: Puntuación de la diarrea de lechones destetados alimentados con suplementos de dodecanoato de etilo o de ácido dodecanoico

| Días | Tratamiento | | | Global | | | |
|--------------------------|-------------|-----------------|-----------------------|--------|----------|----------|----------------------|
| | Control | C ₁₂ | Etilo-C ₁₂ | Media | Estándar | χ^2 | Valor ¹ p |
| Puntuación de la diarrea | 49,84 a | 46,64 ab | 42,41 b | 48,01 | 20,75 | 7,55 | 0,056 |

- 25 De la tabla 3, puede observarse que el dodecanoato de etilo podía reducir significativamente la diarrea mientras que el ácido dodecanoico no lo hacía. Por lo tanto, se puede concluir que el efecto sobre las bacterias patógenas en el tracto intestinal de los lechones de éster etílico es más fuerte que el del ácido graso relacionado.

Ejemplo 7 Efecto de la mezcla de ácidos grasos de cadena media y de dodecanoato de etilo en lechones

30 En una prueba con 48 lechones alojados individualmente se ensayó el efecto de una mezcla de ácidos grasos de cadena media (ácido octanoico, decanoico, ácido dodecanoico) y dodecanoato de etilo en las proporciones relativas de 30%:37%:18%:15%. Esta mezcla se dosificó a un nivel total de 1000 ppm en la alimentación de destete y se administró en las primeras 4 semanas después del destete. Los lechones fueron infectados con *E. coli* β -hemolítica (O149: K88acK91) al día 6 después del destete. Al día 21 después del destete se recogieron muestras de heces de 8 lechones por tratamiento y se midieron los recuentos microbiológicos. Además, cada lechón se puntuó visualmente
35 en cuanto a la consistencia fecal en el mismo período (20-27 días después del destete) para determinar la puntuación de la diarrea.

Tabla 4: Recuentos microbiológicos de heces y puntuación de la diarrea de lechones infectados con *E. coli* β -hemolítica

| | Enterobacteria | <i>E. coli</i> | Lactobacillus | Puntuación de la diarrea |
|---------------------|----------------|----------------|---------------|--------------------------|
| 1. Control | 6,7740 a | 6,2431 a | 7,7108 | 38,1 % |
| 2. AGCM y ésteres | 5,4452 b | 5,2044 b | 7,9165 | 25,0 % |
| Desviación estándar | 1,4179 | 1,2158 | 0,8964 | n. a. |
| Valor de p | $p < 0,10$ | $p < 0,10$ | $p < 0,10$ | $p < 0,10$ |

5 De la tabla 4 puede observarse que una mezcla de ácidos grasos de cadena media y ésteres puede reducir la contaminación microbiana por especies patógenas como *E. coli* (parte de la familia Enterobacteria) e incluso reducir el número de casos de diarrea. Además, las especies microbianas comensales como *Lactobacillus* no fueron inhibidas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Pienso para animales adecuado para alimentar mamíferos, aves y peces, que comprende un éster de alquilo de un ácido graso, en donde dicho ácido graso tiene una longitud de cadena de 5-12 átomos de carbono, y en donde la dosificación de dicho éster en dicho pienso para animales es de 50 ppm en peso o superior, basado en el peso total de dicho pienso para animales, para su uso en la disminución del riesgo de infecciones microbianas en un animal.
2. Pienso para animales según la reivindicación 1, en donde dicho alquilo es metilo, etilo, propilo, butilo o una combinación de los mismos.
3. Pienso para animales según la reivindicación 1 o 2, en donde dicho ácido graso tiene una longitud de cadena de 8-12 átomos de carbono.
- 10 4. Pienso para animales según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho ácido graso es ácido octanoico, ácido decanoico, ácido dodecanoico o una combinación de los mismos.
- 15 5. Pienso para animales según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho éster es octanoato de metilo, decanoato de metilo, dodecanoato de metilo, octanoato de etilo, decanoato de etilo, dodecanoato de etilo, octanoato de propilo, decanoato de propilo, dodecanoato de propilo, octanoato de butilo, decanoato de butilo, dodecanoato de butilo o una combinación de los mismos.
6. Pienso para animales según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la dosificación de dicho éster en dicho pienso para animales es de 100 ppm en peso o superior, preferiblemente 200 ppm en peso o superior, basado en el peso total de dicho pienso para animales.
- 20 7. Pienso para animales según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la dosificación de dicho éster en dicho pienso para animales es menor que 5.000 ppm en peso, preferiblemente menor que 1.000 ppm en peso, basado en el peso total de dicho pienso para animales.
8. Pienso para animales según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además ácidos orgánicos y/o sales de los mismos.
- 25 9. Pienso para animales según la reivindicación 8, en donde dicho ácido orgánico y/o dicha sal del mismo se selecciona del grupo que consiste en ácido pentanoico, octanoico, decanoico, fórmico, acético, propiónico, láctico, butírico, cítrico, málico, fumárico, benzoico, succínico, sórbico, tartárico y/o sal y combinaciones de los mismos, en donde dicha sal es preferiblemente la sal sódica, potásica, amónica o cálcica de dichos ácidos orgánicos.
10. Pienso para animales según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además ácido gálico o un éster de alquilo de ácido gálico.
- 30 11. Pienso para animales según la reivindicación 10, en donde dicho éster de alquilo de ácido gálico es galato de propilo, galato de pentilo, galato de octilo o galato de laurilo.
- 35 12. Pienso para animales adecuado para alimentar mamíferos, aves y peces, que comprende uno o más ácidos orgánicos y un éster de alquilo de un ácido graso, en donde dicho ácido graso tiene una longitud de cadena de 5-12 átomos de carbono, y en donde la dosificación de dicho éster en dicho pienso para animales es de 50 ppm en peso o superior, basado en el peso total de dicho pienso para animales.
- 40 13. Ingrediente, premezcla o suplemento para un pienso para animales adecuado para alimentar mamíferos, aves y peces, que comprende un éster de alquilo de un ácido graso, en donde dicho ácido graso tiene una longitud de cadena de 5-12 átomos de carbono y en donde la dosificación de dicho éster es 1 % en peso o superior, basado en el peso total de dicho ingrediente, premezcla o suplemento, en donde dicho ingrediente, premezcla o suplemento comprende además vitaminas, elementos traza, minerales y ácidos orgánicos.
14. Ingrediente, premezcla o suplemento según la reivindicación 13, para uso en la disminución del riesgo de infecciones microbianas en un animal.
- 45 15. Procedimiento para aumentar la eficiencia de la alimentación en un animal, que comprende alimentar a un mamífero, ave o pez con el pienso para animales como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-12 o con el ingrediente, premezcla o suplemento según la reivindicación 13.
- 50 16. Uso de un éster de alquilo de un ácido graso de cadena media o un éster de alquilo de un producto enriquecido en ácido graso de cadena media en un pienso para animales para mejorar la eficiencia de la alimentación en un animal, en donde dicho ácido graso tiene una longitud de cadena de 5-12 átomos de carbono y la dosificación de dicho éster en dicho pienso para animales es de 50 ppm en peso o superior, basado en el peso total de dicho pienso para animales, y en donde dicho uso no es terapéutico.
17. Ester de alquilo de un ácido graso o éster de alquilo de un producto enriquecido en ácido graso para su uso en un pienso para animales para disminuir el riesgo de infecciones microbianas en un animal, en donde dicho ácido

graso tiene una longitud de cadena de 5-12 átomos de carbono y la dosificación de dicho éster en dicho pienso para animales es de 50 ppm en peso o superior, basado en el peso total de dicho pienso para animales.

Figura 1.

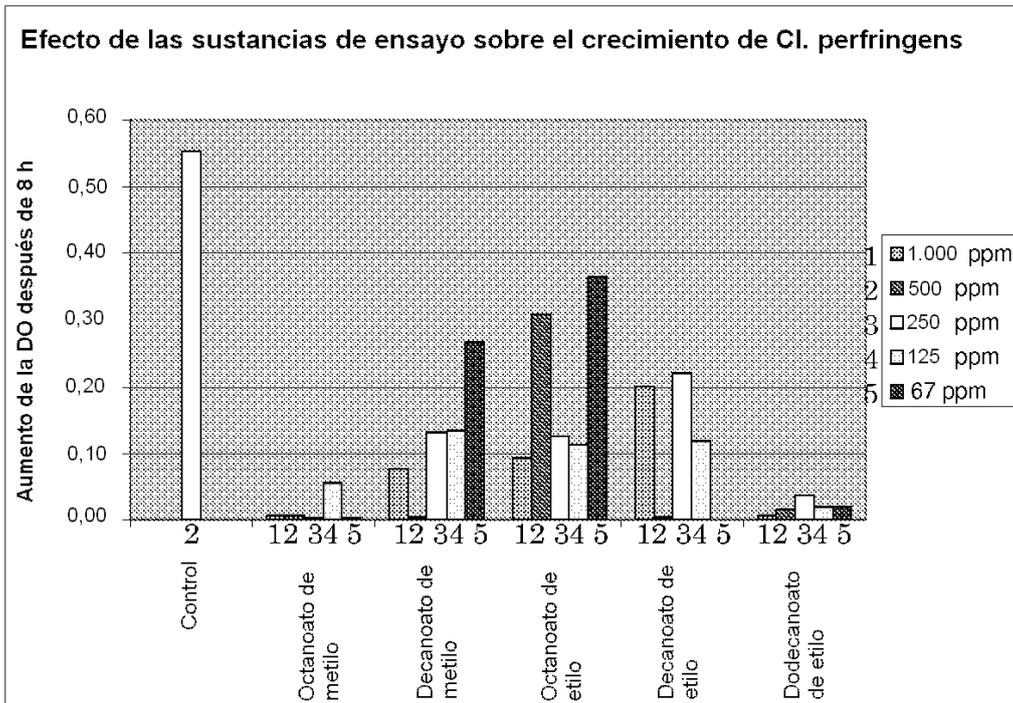


Figura 2.

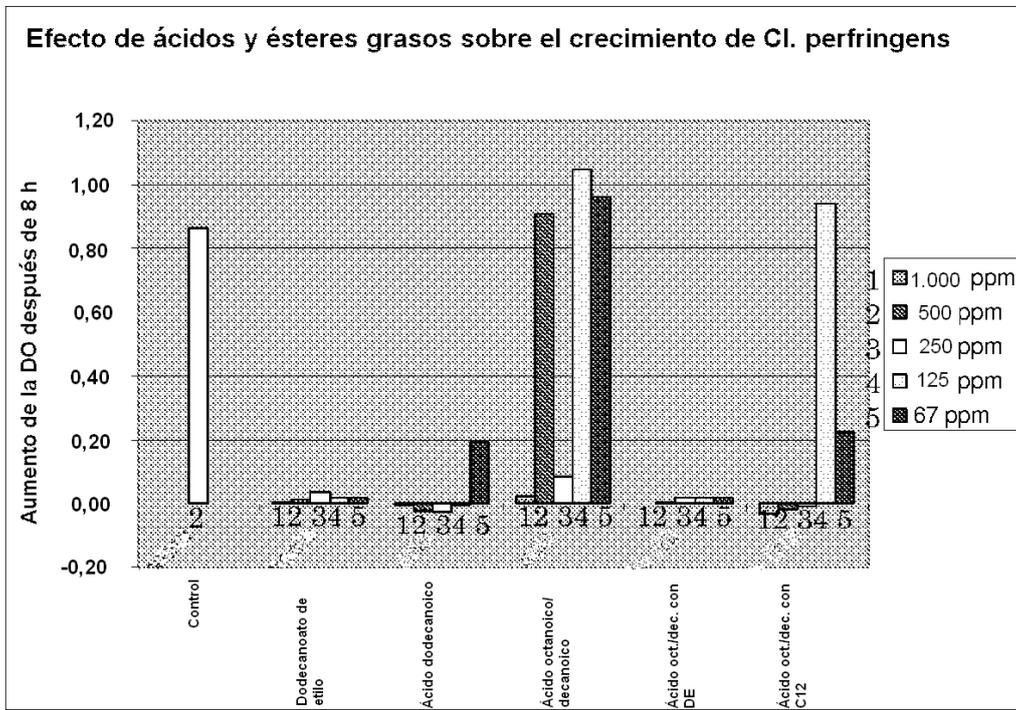


Figura 3.

