

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 102**

51 Int. Cl.:

**A23K 10/30** (2006.01)

**A23K 10/37** (2006.01)

**A23K 20/163** (2006.01)

**A23K 50/10** (2006.01)

**A23K 50/75** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2011 E 11382367 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 2457450**

54 Título: **Composición comestible con Stevia Rebaudiana Bertoni**

30 Prioridad:

**29.11.2010 EP 10382320**

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

**08.09.2017**

73 Titular/es:

**BIOLITTLETEC, S.L. (100.0%)  
Gran Vía de les Corts Catalanes, 702  
08010 Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**SÁNCHEZ-LAFUENTE MARIOL, LUIS y  
CUNÉ CASTELLANA, JORDI**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o  
Bemerkungen) en el folleto original publicado por  
la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 632 102 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**

Composición comestible con Stevia Rebaudiana Bertoni

5 La presente invención tiene por objeto la utilización de una composición comestible para la alimentación de animales. La invención también se refiere a la utilización de la composición con efectos beneficiosos para el propio animal y de los consumidores finales de estos animales o sus subproductos.

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

10 Es ampliamente conocido que el color de la yema de huevo depende de la dieta de la gallina. Por lo tanto, si la dieta contiene los pigmentos vegetales de color amarillo o naranja, conocidos como xantofilas (compuestos del grupo de los carotenoides), entonces se depositan en la yema y potencian el color amarillo en ella. La luteína es el pigmento más abundante en la yema de huevo. Una dieta sin color puede producir una  
15 yema casi incolora. Por ejemplo, si la dieta incluye productos como el maíz amarillo o pétalos de caléndula, el color de la yema será más amarillo. En los Estados Unidos, el uso de aditivos colorantes artificiales está prohibido. Por lo tanto, el patrón de alimentación de las aves de corral es fundamental para obtener el color de la yema deseado.

20 Además, el color y el brillo de la yema de huevo son atributos importantes de calidad que permiten determinar si el huevo está en buen estado para ser ingerido. No obstante, cada región del mundo tiene sus preferencias para el color de la yema, por lo que los criadores de aves de corral deben tener en cuenta lo que sus consumidores  
25 finales prefieren para poder alimentarles en consecuencia.

Es habitual incorporar pigmentos rojos y amarillos (algunos de origen natural y otros procedentes de productos de síntesis) en la alimentación de aves. Durante varias décadas, el color amarillo-naranja ha sido proporcionado por la cantaxantina sintética.  
30 Además, y como se expone en el documento de patente US3539686, se puede obtener una amplia gama de tonos amarillo a rojo con xantofilas, además de otros pigmentos, como cantaxantina, beta-apo-8-caroténico, extractos de pimentón y pimientos rojos.

35 Las xantofilas amarillas se pueden obtener a partir del maíz amarillo, harina de caléndula, y alfalfa, mientras que el pigmento rojo es proporcionado por la

cantaxantina sintética (Hoffman-La Roche, BASF) descrito anteriormente. Sin embargo, el uso de algunos pigmentos sintéticos está limitado en muchos países. Determinados pigmentos rojos naturales pueden obtenerse a partir de la pimienta, y el amarillo de los pigmentos sintéticos puede obtenerse a partir de la citranaxantina (BASF) o éster etílico del ácido beta-apo-8-caroténico (Hoffman-La Roche)

Otra manera de ajustar la coloración de la yema de huevo es a través del pienso suplementado con espirulina, un alga verde-azul con forma de espiral que vive tanto en agua dulce como salada. Espirulina es el nombre común de esta cianobacteria, utilizada tanto en alimentación humana como animal, se producen principalmente a partir de dos especies de cianobacterias: "Arthrospira platensis" y "Arthrospira máxima". Aunque conocida como "alga", ya que son los organismos acuáticos capaces de realizar el procedimiento de la fotosíntesis, las cianobacterias no están relacionadas con ninguna alga eucariota. La espirulina contiene muchos pigmentos, incluyendo clorofila-a, xantofila, beta-caroteno, echinenone, myxoxanthophyll, zeaxantina, cantaxantina, diatoxanthin, 3'hydroxyechinenone-, beta-criptoxantina y oscillaxanthin, además de la c-ficocianina, ficobiliproteínas y aloficocianina.

La clave para la pigmentación de las yemas de huevo con espirulina es el contenido de carotenoides en la misma. Por lo tanto, para potenciar la pigmentación de la yema es importante suministrar espirulina con altas concentraciones de carotenoides. Sin embargo, las diferentes espirulinas producidas en diferentes partes del mundo dan lugar a diferentes colores. Si las condiciones de crecimiento no son favorables, pueden dar lugar a espirulinas con bajas concentraciones en carotenoides.

Debido a la creciente demanda de alimentos de "aspecto saludable", y también teniendo en cuenta la importancia del bienestar de los animales, se ha generado una necesidad de utilización de fuentes de pigmentación alternativas que cumplan con las normativas reglamentarias de los diferentes países.

30

## RESUMEN DE LA INVENCION

Los inventores han encontrado que la incorporación de una mezcla en una proporción determinada de las hojas y el tallo de la planta Stevia Rebaudiana en los piensos de las gallinas, mejora la coloración de la yema de huevo y endurece la cáscara del huevo. Por lo tanto, los inventores han proporcionado una composición comestible que

35

es útil como agente de coloración de la yema de huevo, y también como agente de endurecimiento de la cáscara del huevo.

5 Pero el uso más conocido de la Stevia Rebaudiana no es ni como agente de pigmentación, ni como agente de coloración de la yema de huevo. Stevia Rebaudiana es más conocida como agente edulcorante, en forma de extracto o en forma natural (la misma planta).

10 Esta composición comestible es segura para los animales y permite la regulación de la luminosidad y el color de la yema del huevo a través de ingredientes naturales, que pueden ser incorporados en la dieta común de los animales.

15 En consecuencia, un aspecto de esta invención es la disponibilidad de una composición comestible que contiene una cantidad de glicósidos de esteviol de entre 150 partes por millón (ppm) y 3000 ppm, la composición está formada por una mezcla de partículas sólidas secas (o mezcla de sólidos desecados) que es una mezcla de hojas y tallos de la planta Stevia Rebaudiana, las hojas y el tallo pueden estar en una proporción variable comprendida entre 25:75 y 35:65 P/P %, donde la mezcla de partículas sólidas secas en relación con el peso total de la composición comestible se encuentra entre el 0.025%-0.5%.

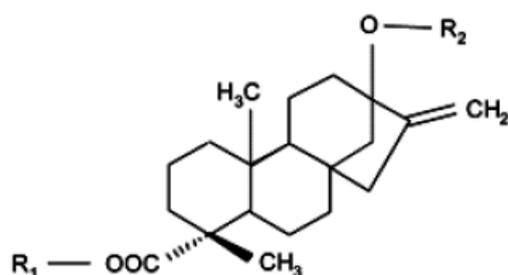
25 En otras palabras, la composición comestible comprende, junto con otro ingrediente comestible aceptable, una cantidad de mezcla de partículas sólidas secas (o mezcla de sólidos desecados) que es la mezcla de hojas y tallos de la planta Stevia Rebaudiana, las hojas y los tallos en un ratio comprendido entre el 25:75 y 35:65 w/w %. Dicha cantidad da un ratio de concentración final de glucósidos de esteviol comprendida entre 150 partes por millón (ppm) con respecto al peso total de la composición comestible.

30 La selección de los ingredientes comestibles aceptables y los métodos más apropiados para la preparación de la composición comestible está al alcance de las personas comunes expertas en el arte de la tecnología de los alimentos.

35 El término "ingrediente comestible aceptable como se usa aquí, se refiere a los compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que son aceptables para su uso en preparaciones alimenticias, tales como vitaminas, proteínas, fibra,

carbohidratos, grasas, etc., que son ampliamente empleados en piensos, suplementos nutricionales, preparaciones líquidas, etc. Cada ingrediente debe ser “aceptable” en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación.

- 5 En el sentido de la invención, una “cantidad de glicósidos de esteviol” significa que las mezclas de los compuestos de fórmula (I) se incluyen en la composición comestible, es decir, una mezcla de esteviósidos, rebaudiósidos A, B, C, D, E y F, dulcósido A, esteviolbiósido y rubusósido. Las proporciones específicas de cada uno de ellos pueden variar en función de la parte de la planta utilizada. Se entiende que no todos  
10 los glicósidos de esteviol tienen que estar presentes en la mezcla.



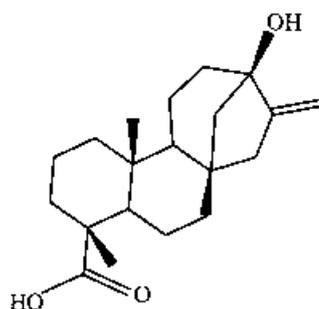
(I)

- 20 Stevia Rebaudiana Bertoni es una de las 240 especies del género Stevia en la familia de Asteraceae. Stevia Rebaudiana Bertoni es una planta originaria del Sur de América Tropical, ampliamente cultivada y comercializada en Paraguay. Desde hace siglos, los guaraníes, tribus de Paraguay, Bolivia y Brasil utilizan la stevia, a la que llamaron “ka’a he’ ê” (“hierba dulce”), como edulcorante en la yerba mate e infusiones medicinales  
25 para tratamiento de la acidez estomacal y otras dolencias. Es una planta con otros múltiples usos, y ha sido ampliamente utilizada por personas diabéticas. También las tradiciones populares atribuyen a la Stevia Rebaudiana, propiedades tales como agente anti-envejecimiento, producto contra la artritis y contra la artrosis, agente paliativo en el tratamiento de la alergia, anti-hipertensivo y también estimula el  
30 páncreas a restablecer sus funciones productoras de insulina en diabetes tipo II.

- En la actualidad, el espectro molecular de los extractos de Stevia Rebaudiana está siendo ampliamente estudiado. De todos modos, es bien sabido que esteviósidos y rebaudiósidos son los principios activos responsables del efecto edulcorante. La  
35 obtención de los agentes edulcorantes de la planta se realiza generalmente con una primera extracción de esteviósidos y rebaudiósidos de la planta, seguido por un filtrado

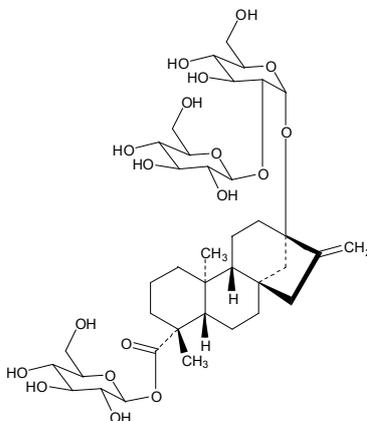
de las impurezas y posteriormente se realiza una segunda extracción con disolventes específicos para extraer los principios activos. Este procedimiento implica que la mayoría de los componentes de la planta con propiedades antibióticas se han perdido o descompuesto.

- 5 La mayoría de las propiedades atribuidas a la Stevia Rebaudiana se deben a la presencia de los glicósidos de esteviol de la fórmula (I). El esteviol (fórmula II), que es un diterpeno, es conocido como la aglicona de los glicósidos dulces de Stevia.



(II)

- En la tabla A, se enumeran los glicósidos de esteviol identificados. Se construyen a partir de la sustitución del átomo de hidrógeno-carboxilo del esteviol con la glucosa para formar un éster, y el hidrógeno del hidroxilo (R2) con una combinación de glucosa y ramnosa. El esteviol también se denomina ácido (4 $\alpha$ )-13-hydroxykaur-16-en-18-oico con número de registro CAS 471-80-7. Los dos principales componentes derivados del esteviol, el esteviósido y rebaudiósido A, utilizan sólo glucosa: el esteviósido, el componente de fórmula (III) o (4- $\alpha$ ) – 13 – [(2-O- $\beta$ -D-glucopiranosil- $\beta$  glucopiranosil D) oxi ] kaur-16-en-18-oico ácido  $\beta$ -D-glucopiranosil (número de registro CAS57817-89-7), tiene dos moléculas de glucosa unidas por el grupo hidroxilo, mientras que rebaudiósido A tiene tres.



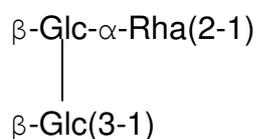
(III)

Tabla A: Estructuras químicas de varios glicósidos de esteviol.

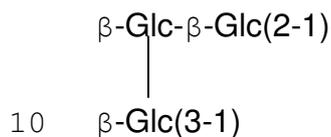
Diterpeno glicósido	R <sub>1</sub> <sup>a</sup>	R <sub>2</sub> <sup>a</sup>
Esteviolbíosido (V)	H	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2-1)
Rubusósido (VI)	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc
Estevióside (III)	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2-1)
Rebaudiósido A (IV)	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2-1)	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2-1)   $\beta$ -Glc(3-1)
Rebaudiósido B (VII)	H	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2-1)   $\beta$ -Glc(3-1)
Rebaudiósido C (dulcósido B) (VIII)	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc- $\alpha$ -Rha(2-1)   $\beta$ -Glc(3-1)
Rebaudiósido D (IX)	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2-1)	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2-1)   $\beta$ -Glc(3-1)
Rebaudiósido E (X)	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2-1)	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2-1)
Rebaudiósido F (XI)	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc- $\beta$ -Xyl(2-1)   $\beta$ -Glc(3-1)
Dulcósido A (XII)	$\beta$ -Glc	$\beta$ -Glc- $\alpha$ -Rha(2-1)

<sup>a</sup>: Glc es  $\beta$ -D-Glucopiranosil (glucosa); Rha es  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl; Xyl es  $\beta$ -D-Xylopyranosyl (xilosa);

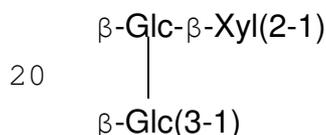
$\beta$ -Glc- $\beta$ -Glc(2-1) significa que el radical es un disacárido de dos glucosas con un enlace glicosídico que se establece entre el carbono 2 de la glucosa unido a la estructura del diterpeno de fórmula (I) y el carbono 1 del otro monómero glucosa ( $\beta$ -D-glucopyranosyl);



significa que el radical es un trisacárido de dos monómeros de glucosa y una ramnosa, donde un enlace glicosídico se establece entre el carbono 3 de la glucosa unido a la estructura del diterpeno de fórmula (I) y el carbono 1 de otro monómero de glucosa ( $\beta$ -D-glucopyranosyl), y otro enlace glicosídico se establece entre el carbono 2 de la glucosa unido a la estructura del diterpeno de fórmula (I) y al carbono 1 de una  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl;



significa que el radical es un trisacárido de tres monómeros de glucosa donde un enlace glicosídico se establece entre el carbono 3 de la glucosa unido a la estructura diterpeno de fórmula (I) y el carbono 1 de una molécula de glucosa ( $\beta$ -D-glucopyranosyl) monómero, y otro enlace glicosídico se establece entre el carbono 2 de la glucosa unido a la estructura del diterpeno de fórmula (I) y al carbono 1 de una molécula de glucosa ( $\beta$ -D-glucopyranosyl) monómero;



significa que el radical es un trisacárido de dos monómeros de glucosa y una xilosa ( $\beta$ -D-Xylopyranosyl), donde un enlace glicosídico se establece entre el carbono 3 de la glucosa unido a la estructura diterpeno de fórmula (I) y al carbono 1 de otro monómero de glucosa ( $\beta$ -D-glucopiranosil), y otro enlace glicosídico se establece entre el carbono 2 de la glucosa unido a la estructura del diterpeno de fórmula (I) y al carbono 1 de un  $\beta$ -D-Xylopyranosyl (xilosa);

30  $\beta$ -Glc- $\alpha$ -Rha(2-1) significa que el radical es un disacárido de glucosa en la que se establece un enlace glicosídico entre el carbono 2 de un monómero de  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl;

35 El cultivo de Stevia Rebaudiana está muy extendido en todo el mundo (Australia, Canadá, India, México, Brasil, Paraguay. Bolivia, etc) aunque su origen es del sur de la América tropical. A efectos de la presente invención, puede ser utilizada Stevia

Rebaudiana de diferentes orígenes y países. Aunque, preferentemente, se utiliza Stevia Rebaudiana de la cordillera de Amambay.

Un segundo aspecto de la invención es el procedimiento para la preparación de la composición comestible definida anteriormente y que comprende las siguientes etapas:

a) Secado de la planta Stevia Rebaudiana a una temperatura entre 18°C y 35°C.

b) Separación de tallos y hojas para obtener una fracción seca del tallo y una fracción seca de hoja, y

c) la mezcla de fracciones de hojas y tallo de la planta Stevia Rebaudiana en una proporción comprendida entre 25:75 y 35:65 w/w %, para obtener una mezcla de sólidos secos.

Como la cantidad de glicósidos de esteviol debe estar comprendida entre 150ppm y 3000ppm en la composición comestible, la composición comestible comprende la cantidad apropiada de la mezcla de sólidos secos que produce la cantidad de glicósido de esteviol indicada previamente en la composición comestible. Las cantidades de la mezcla de sólidos secos están generalmente comprendidas entre 0.025% y 2% en peso de la mezcla de sólidos secos (25:65 y 35:65% w/w de hoja:tallo) en la composición comestible final (por ejemplo, pienso).

La planta puede ser desecada al natural a temperatura ambiente o mediante desecadores de aire caliente. La desecación de forma natural puede hacerse extendiendo los tallos y hojas en un lecho al calor del sol en un invernadero.

La composición comestible según la invención es también adecuada para ser utilizada como ingrediente de varios alimentos procesados. De este modo, un tercer aspecto de la invención es un pienso que comprende una cantidad eficaz de la composición comestible tal como se ha definido anteriormente.

A su vez, otro aspecto se refiere a la composición comestible que es en sí misma un alimento procesado, en particular un pienso. En otras palabras, de acuerdo con otro aspecto de la invención, la composición comestible de la invención es un pienso.

El término "cantidad eficaz" tal como se usa aquí, significa Una cantidad de agente activo lo suficientemente alta como para proporcionar el beneficio deseado, pero lo suficientemente baja para evitar efectos secundarios graves dentro del ámbito del

criterio médico.

Otro aspecto de la invención es un método para preparar un pienso como se ha definido anteriormente y que comprende mezclar una composición comestible animal en forma de polvo y una composición comestible que tiene una cantidad de glicósidos de esteviol comprendidos entre 150ppm y 3000ppm, que comprende una mezcla de sólidos secos que es una mezcla de las hojas y tallos de la planta Stevia Rebaudiana, siendo las hojas y los tallos en una proporción comprendida entre 25:75 y 35:65% p/p. Por lo tanto, el método para preparar este pienso comprende mezclar una composición comestible animal en forma de polvo, con la composición comestible como se define arriba.

Varios tamaños de partícula para la composición comestible en polvo, a los que se añade la composición comestible de la invención, comprenden de 0.1mm a 10mm. Este intervalo de tamaños de partícula también es aplicable a la mezcla de sólidos secos de hojas y tallos de Stevia Rebaudiana en el caso de que esta mezcla de hojas y tallos se añada también en forma de polvo (previamente moliendo la mezcla hasta el tamaño de partícula deseado promedio). La composición comestible animal incluye las proteínas, vitaminas, grasas, sales aminoácidos y celulosa usualmente presentes en estos tipos de composiciones. La variación de porcentajes y componentes puede existir dependiendo del consumidor animal final.

Otro aspecto de la invención, es utilizar el composición comestible de la invención como aditivo del pienso como suplemento nutricional.

Como se ilustra en los ejemplos que aparecen a continuación, las composiciones comestibles o piensos que la contengan,, sorprende que influyan en el color resultante de la yema del huevo, proporcionando así un avance tecnológico con una nueva aplicación que, a parte de ser bueno para las aves de corral debido a las propiedades encontradas y las ya conocidas de la Stevia Rebaudiana (sabor dulce), sirve como un agente de pigmentación natural. Por lo tanto, otro aspecto de la invención es el uso de la composición comestible definida anteriormente, como agente colorante de la yema del huevo.

En el sentido de la invención, un “agente colorante de yema de huevo” incluye cualquier compuesto natural o sintético que afecte o finalmente intervenga en el tono

de la yema del huevo, debido a la coloración inherente del componente o debido a la transformación del mismo en el organismo de la gallina.

5 A parte de esta interesante e inesperada propiedad de la composición comestible objeto de la invención, los inventores han encontrado que la invención también mejora la resistencia de la cáscara del huevo. La resistencia de la cáscara es también un punto crítico para los productores de aves de corral, ya que la comercialización de los huevos depende de la edad de las gallinas y la suficiente calcificación de la cáscara de los huevos. La calcificación de la cáscara de los huevos es especialmente crítica en  
10 gallinas viejas. Si la cáscara del huevo no es suficientemente resistente, cuando las gallinas ponen huevos y se rompen, deben desecharse y no pueden ser comercializados.

15 Por lo tanto, otro aspecto de la invención es el uso de la composición comestible como agente endurecedor de la cáscara del huevo.

En el documento EP 110676, correspondiente a métodos para la cría de animales para alimentación, los inventores dan a conocer un producto en polvo, procedente de la planta Stevia, que se añade al pienso en una cantidad entre 0.5% al 7% en peso. En el  
20 ensayo realizado, el grupo de gallinas alimentadas con Stevia presentan una mayor resistencia a la rotura que las gallinas control, dicha proporción es de un 1.0% frente a un 2.873% del grupo control.

25 Como quedará ilustrado en siguientes ejemplos, los valores de menores pérdidas por rotura de la cáscara del huevo, según la presente invención, son sorprendentemente mucho más interesantes. En concreto, están por debajo del 1.0%. Sin estar ligado a la teoría, los inventores defienden que la cantidad de glicósidos de esteviol en el pienso para animales con la proporción adecuada de tallos y hojas de Stevia Rebaudiana produce un efecto sinérgico que favorece el endurecimiento de la cáscara de huevo.

30 Como “agente endurecedor de la cáscara de huevo” debe entenderse cualquier compuesto, composición o combinación de ingredientes, que al final interviene en las vías metabólicas implicadas en la calcificación o formación de la cáscara del huevo. Como ejemplos de agentes endurecedores se incluyen el carbonato de calcio y un  
35 polvo fino procedente de conchas de moluscos, que es rico en la sal de calcio antes mencionada.

Los inventores también han encontrado que el rango de concentración específico seleccionado de los glicósidos de esteviol, presentes en la composición comestible o pienso, en una determinada proporción, así como una determinada proporción específica de hojas y tallos en forma de partículas sólidas desecadas, mejoró el factor de conversión del pienso (FCR) y aumentó el peso corporal medio diario (DMG), o lo que es lo mismo, el peso (en gramos) aumentó a diario.

Por lo tanto, aunque se sabe que la Stevia Rebaudiana puede mejorar la producción animal (véase, por ejemplo RU2376863C2), generalmente debido a una mayor ingesta del alimento dulce y a una mayor tasa de conversión o índice de conversión (FCR), la mejora observada en las tasas del índice de conversión (FCR) por el uso de la composición comestible de la presente invención, puede ser considerada como una importante contribución para aumentar la productividad animal. Además, aunque en RU2376863C2 se da a conocer un pienso o pienso que contiene entre un 18-19% en peso de un suplemento herbario de Stevia Rebaudiana, esta cantidad representará concentraciones de glicósidos de esteviol en el pienso final muy elevadas comprometiendo su palatabilidad.

En consecuencia, otro aspecto de la invención es el uso de la composición comestible definida anteriormente como potenciador de la productividad animal.

FCR es la relación entre el aumento de peso del animal y el peso de pienso ingerido.

El término “potenciador de la productividad animal” se refiere a las composiciones, suplementos alimenticios o compuestos que se les da al ganado para que transformen de manera eficiente el alimento ingerido a producción de carne, o para tener mejores índices de conversión, que es un valor que indica los kg de peso ganado por 1 kg de alimento consumido. Un “potenciador de la productividad de los animales” puede intervenir también en la mejora de la producción de leche (en términos de calidad y/o cantidad) o en el cultivo de piel o lana del animal. Ejemplos ampliamente utilizados de “potenciadores de la productividad de los animales” son los probióticos como BioPlus2b (una mezcla de cepas de Bacillus), ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como el ácido propiónico, y cobre (Cu). Los potenciadores de la productividad también son conocidos como promotores, potenciadores de la carne, o potenciador de productos derivados de los animales (cuando se relaciona por ejemplo con la

producción de leche, lana, piel, etc.).

Cabe mencionar que la composición comestible de la invención utiliza la Stevia Rebaudiana en forma natural, es decir, en forma de polvo seco o como mezcla de partículas sólidas secas de las hojas y tallos de la planta. De esta forma, se evitan los procedimientos de extracción. Además, la presencia de las diferentes partes de la planta, incorpora un porcentaje importante de fibra dietética, y lo que es de especial interés: las propiedades antibióticas atribuidas a la planta no se pierden.

Como se indicó anteriormente, en el caso de que la mezcla de partículas sólidas secas de hojas y tallos se use en forma de polvo, el tamaño de partícula preferido está comprendido entre 10 micras y 10.0 mm. Los rangos más preferidos están entre 10 micras y 5.0 mm. Por otra parte, la mezcla de tallos y hojas en las proporciones indicadas, puede comprender una mezcla de fragmentos sólidos que no reduce la consistencia de polvo. La mezcla deberá ser distribuida de forma homogénea en el pienso con el fin de asegurar que todos los animales lo consuman de forma constante, junto al resto de componentes del pienso.

Los inventores han encontrado también que la Stevia Rebaudiana incluida en una composición comestible aumentó inesperadamente los recuentos de bacterias ácido-lácticas (BAL). Por lo tanto, otro aspecto de la invención sería para el uso en la prevención y/o tratamiento des desequilibrio en la microbiota del tracto gastrointestinal de los animales.

Por último, otra aplicación de la composición comestible de la invención es como suplemento nutricional, conjuntamente con al menos un compuesto que contenga una fuente de: vitaminas, minerales, fibra, ácidos grasos y aminoácidos.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 1 es un diagrama de barras y líneas que muestra el crecimiento de los animales y el consumo de pienso de los animales respectivamente, expone que los animales tienen acceso a un pienso que incluye el componente, objeto de la invención, (pienso Stevia o S) y otro con un suplemento de sacarina (pienso de control o C) durante dos semanas de tratamiento. Se muestran los datos de animales de bajo peso (L) y los animales de mayor peso (H) para cada una de las concentraciones de

glicósidos de esteviol (Stevia) y sacarina ensayadas. Las líneas vinculadas representan el consumo total de pienso que contiene Stevia Rebaudiana.

5 La FIG. 2 es una gráfica que ilustra el porcentaje de preferencia estudiado para los lechones alimentados con un pienso suplementado con una composición de Stevia Rebaudiana en relación con el grupo control suplementado con la misma cantidad de sacarina. Las ppm indican la concentración en partes por millón de glicósidos de esteviol añadidos en el pienso de los diferentes grupos examinados durante 2 semanas (2W). También se muestran los datos de la primera semana (W), así como la  
10 media (MW) obtenida de ambas semanas.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

15 La composición comestible de la invención contiene una cantidad de glicósidos de esteviol comprendida entre 150 ppm y 3000 ppm, y una mezcla de hojas y tallos de la planta Stevia Rebaudiana, que están en una proporción comprendida entre 25:75 y 35:65 w/w%. Dicha mezcla se obtiene a partir de un procedimiento que comprende las siguientes etapas:

- 20 a) secado de la planta Stevia Rebaudiana a una temperatura comprendida entre los 18-35°C
- b) Separación de tallos y hojas para obtener una fracción seca de tallo y una fracción seca de hoja, y
- c) mezcla de las fracciones secas de hojas y tallos de la planta Stevia Rebaudiana en una proporción comprendida entre 25:75 y 35:65 w/w%, para obtener la mezcla  
25 adecuada de sólidos secos.

La composición comestible incluye la cantidad de esta mezcla de fracciones de hojas y tallos que proporciona un rango de glucósidos de esteviol comprendido entre 150 ppm y 3000 ppm.

30

La abreviatura w/w% significa relación de porcentaje en peso.

La composición comestible anterior se obtiene por el procedimiento definido arriba, que comprende además la adición de la mezcla de sólidos secos de la etapa c) a otros  
35 componentes del composición en tal cantidad que el composición comestible tenga una cantidad final de glucósidos de esteviol comprendida entre 150 ppm y 3000 ppm.

En una realización preferida el procedimiento además incluye el molido de las hojas y los tallos de la etapa c) para obtener un polvo.

5 Esta composición comestible ha sido probada en diferentes ensayos experimentales a diferentes concentraciones. De todos estos ensayos es derivable que una preferida realización de la invención es una composición comestible que contenga una cantidad de glicósidos de esteviol comprendida entre 150 partes por millón (ppm) y 3000 ppm, la composición está compuesta de una mezcla de sólidos secados (o mezcla de sólidos  
10 secos) que es una mezcla de las hojas y de los tallos de la planta Stevia Rebaudiana, las hojas y los tallos están en un ratio comprendido entre 25:75 y 35:65 w/w%, donde la mezcla de los sólidos secos en relación con el peso total de la composición comestible está comprendida entre 0.025% - 0.5% del peso final de la composición comestible.

15 Especialmente preferida es la cantidad comprendida entre 0.05% - 0.5% y también entre 0.05% - 0.4%. El 0.056% como el peso de la mezcla de sólidos secos (25:75 y 35:65 w/w% de hojas:tallos) en la composición comestible final es la proporción más preferida. Los ejemplos ilustran una particular realización cuando la proporción de la  
20 mezcla de sólidos secos en el composición comestible es del 0.056% que corresponde a una concentración de 300 ppm de glicósidos de esteviol en el pienso final o composición comestible. En los ejemplos también se ilustra otra particular realización cuando la proporción de la mezcla de sólidos secos en la composición comestible es del 0.5%, que corresponde a una concentración de 3.000 ppm de glicósidos de esteviol  
25 en el pienso final o composición comestible.

Otra realización preferida es una composición comestible en el que el ratio entre las hojas y los tallos de Stevia Rebaudiana sea 30:70 w/w%.

30 En otra realización preferida, los glucósidos de esteviol en la composición comestible están en una concentración final comprendida entre 150 ppm y 1500 ppm, siendo el más preferido a una concentración final de 300 ppm.

También en una realización preferida, la composición comestible está compuesta por  
35 una mezcla de rebaudiósido A, esteviósido, rebaudiósido F, rebaudiósido C, dulcósido A, un componente aislado no identificado con un peso molecular de 804 g/mol;

MW804, rubusósido y rebaudiósido B.

5 La composición comestible de la invención puede ser formulada en forma de polvo o en forma de líquido (es decir, una infusión de líquidos extraídos del polvo o por disolución del polvo) para ser utilizada como aditivo alimentario, o como suplemento  
10 nutricional o como un pienso. Cuando se formula como un aditivo alimentario puede ser agregado a cualquier alimento preparado previamente o a líquidos, como leche, agua enriquecida con vitaminas, jugos de frutas, e incluso se puede mezclar en formulaciones con fármacos. Como ya se ha indicado anteriormente, la composición  
15 comestible puede ser considerada como un alimento preparado, en particular un pienso o un suplemento nutricional.

15 Por consiguiente, también en una realización preferida, la composición comestible acorde con la invención, es un pienso.

15 En otra realización preferida, la composición comestible comprende la mezcla de hojas y tallos de la Stevia Rebaudiana procedente del Paraguay.

20 Los suplementos nutricionales que componen la composición comestible de la invención incluyen todos los ingredientes esenciales útiles para proporcionar los nutrientes, tales como las vitaminas, minerales, fibra, ácidos grasos o aminoácidos, que podrían no estar presentes o no ser consumidos en cantidad suficiente en la dieta. La composición comestible no afecta a la absorción de todos los demás nutrientes.

25 Si, por otro lado, el pienso es la mezcla que contiene la composición comestible de la invención, incluye los ingredientes comunes de este tipo de composiciones, tales como heno, paja, ensilaje, alimentos comprimidos y granulados, aceites y raciones mixtas, melaza y también granos germinados y legumbres.

30 Cuando la composición comestible se mezcla en un pienso para gallinas, se incrementa la producción de huevos, incluso las gallinas viejas producen cáscaras de huevos resistentes, minimizando así la pérdida de producción, y por otra parte la yema de huevo tiene un buen brillo y un color amarillento característico. La composición comestible que contiene glicósidos de esteviol proporcionados por un componente de  
35 la planta Stevia Rebaudiana (tallo y hojas), es, además, beneficiosa para las aves de corral y animales en general, ya que les proporciona una cantidad interesante de fibra

digestiva. Por otra parte, la yema del huevo tiene una gran luminosidad, lo que demuestra la buena salud de las gallinas y los huevos obtenidos de estas. Este hecho facilita el aumento de confianza del consumidor final con respecto a la salud de las gallinas y de los huevos de alta calidad producidos.

5

Por lo tanto, está bien documentado por medio de los siguientes ejemplos, que la Stevia Rebaudiana puede ser utilizada como agente colorante de la yema de huevo y como agente endurecedor de la cáscara de huevo. Para todas estas aplicaciones relacionadas con el huevo, se utiliza toda la planta de Stevia Rebaudiana y preferiblemente de forma natural. Esto significa que las hojas y los tallos de la planta proporcionan interesantes resultados. Por lo tanto, se considera también parte de la invención, el uso de la Stevia Rebaudiana como agente colorante de la yema del huevo y como agente endurecedor de la cáscara del huevo. En una realización preferida, aunque la Stevia Rebaudiana se utiliza como un polvo seco, puede ser utilizada en otras formas de elaboración, por ejemplo la forma más sencilla: recolectada, secada con posterioridad y cortada para ser comida por aves de corral (gallinas ponedoras de huevos). Puede utilizarse una amplia gama de diferentes proporciones de hoja y tallo. De hecho, todas las proporciones de tallo/hoja de planta son utilizables.

20

Por otra parte, tal y como se ilustra a modo de ejemplos, la ingestión de la composición comestible de la invención, proporciona varias ventajas en la producción animal. En primer lugar, los animales comen una gran cantidad de alimentos y los índices de conversión alimenticia (FCR) son mejores. Este aspecto es de especial interés en el ámbito de la productividad animal. Pero la fase crítica y donde la composición comestible de la invención es crucial, es de la fase de destete de los mamíferos a la fase de engorde. Esto es así, ya que cuando los mamíferos (lechones, cabritos, conejos, etc.) son separados de sus madres sufren un gran estrés. Lo mismo es aplicable a las aves de corral (pollo, pato, ganso, etc.), que sufren estrés cuando están en corrales o gallineros.

30

Así, el uso de la composición comestible de la invención como potenciadora de la productividad de los animales, se considera otra aplicación de la invención. En una realización preferida, la mejora de la productividad de los animales consiste en aumentar la producción de carne. Esta carne es de gran utilidad y siempre obtenida de una fuente natural.

35

En otra realización preferida, la mejora de la productividad consiste en aumentar la producción de leche.

5 A lo largo de la descripción y las explicaciones, la palabra “comprende” y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Otros objetos, ventajas y características de la invención, serán evidentes para los expertos en la materia durante la revisión y la descripción, o bien se puede deducir por la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se  
10 proporcionan a modo de ilustración, y pretenden ser restrictivos para la presente invención. Por otra parte, la actual invención abarca todas las combinaciones posibles de las realizaciones preferidas y particulares aquí descritas.

## EJEMPLOS

15

Ejemplo 1. Efecto de la composición sobre el color de la yema de los huevos.

Un pienso de uso común para las gallinas productoras de huevos se complementó con la mezcla del pienso descrito abajo con la composición comestible de la invención,  
20 incorporando 300 ppm de glucósidos de esteviol en forma de polvo (tamaño de partícula de 1.0mm a 5.0mm) de proporción (30:70 / hojas:tallo) de Stevia Rebaudiana de Paraguay (cordillera de Amambay).

El pienso y agua se suministraron a voluntad a 18 gallinas productoras de huevos (de  
25 raza autóctona). 9 gallinas recibieron el pienso complementado con glicósidos de esteviol de la Stevia Rebaudiana y el grupo control, con otras 9 gallinas, recibió sólo el pienso. Las gallinas fueron alojadas en grupos de 3. El consumo de pienso de cada grupo era aproximadamente de 1.0Kg.

30 La composición de los piensos (en porcentaje en peso) fue: maíz (50%), soja tostada (18.54%), trigo (14.50%), carbonato de calcio (9.54%), semillas de soja tostada (2.42%), gluten de maíz (2.00%), grasa animal (1.00%), bifosfato de calcio (0.87%), cloruro de sodio (0.51%), bicarbonato de sodio (0.10%) y aditivos vitamínicos (1.03%).

35 El pienso empleado fue un pienso completo para gallinas en fase productiva (de 2 meses a día del sacrificio).

Las muestras de huevos de las gallinas en los meses 1, 3 y 4 se utilizaron para la determinación del color de la yema del huevo (9 repeticiones).

5 Las yemas de huevo fueron agitadas de la clara de huevo y homogeneizadas individualmente con un agitador. El color se midió con un colorímetro Hunter Lab MiniScan XTE (Asociados Hunter laboratorio INC, Reston, Virginia, EEUU.). Las siguientes coordenadas se midieron: CIELAB,  $L^*$ ,  $a^*$   $b^*$  y con un iluminador D65 y un observador estándar de  $10^\circ$ .

10 El sistema CIE  $L^*a^*b^*$  (CIELAB) es el más completo en especificación de color y fue descrito por la Comisión Internacional en Iluminación (French Commission Internationale de l'Éclairage, por lo tanto sus iniciales son CIE). Este sistema describe todos los colores visibles por el ojo humano y fue creado para servir como un modelo independiente del dispositivo para ser utilizado como una referencia.

15 Las tres coordenadas CIELAB representan la luminosidad del color ( $L^* = 0$  rendimientos negro y  $L^* = 100$  indica blanca difusa, el blanco especular puede ser mayor), su posición entre el rojo/magenta y verde ( $a^*$ , valores negativos indican verde mientras que los valores positivos indican magenta) y su posición entre el amarillo y el azul ( $b^*$ , valores negativos indican azul y valores positivos indican amarillo).

20 El cuadro 1 muestra la media de las nueve repeticiones analizadas con las yemas de huevos recolectados de gallinas alimentadas con el pienso que contiene la composición comestible de la invención (muestra A), y la media de las nueve repeticiones del grupo control, sin el suplemento de la composición comestible de la invención en el pienso (muestra B).

Tabla 1. Color de las yemas de huevo

Coordenadas (parámetros)	A	B
$L^*$	$62.74 \pm 0.62$	$52.69 \pm 3.34$
$a^*$	$25.79 \pm 0.86$	$26.28 \pm 1.94$
$b^*$	$72.96 \pm 1.98$	$64.41 \pm 4.21$

30 De los datos expuestos en la tabla 1 se deduce que la yema de huevo de las gallinas

alimentadas con un pienso que contiene la composición comestible de la invención tienen mayor brillo y un tono amarillo más intenso que las yemas de los huevos procedentes de las gallinas controles. Este brillo es indicativo del estado de salud de las gallinas.

5 A destacar, que el efecto sobre la coloración de la yema de huevo se consigue sin afectar a la resistencia a la rotura de la cáscara de los huevos. El peso del huevo no se ve comprometido ya que no se observa variación o incluso puede presentar valores más altos.

10 Ejemplo 2A. Efecto en la rigidez de la cáscara de los huevos. Estudio comparativo de la resistencia a la rotura de los huevos.

15 El objetivo de este ensayo fue comparar la resistencia a la rotura de los diferentes huevos. Este parámetro es indicativo de la dureza de la cáscara del huevo.

20 Siguiendo el mismo esquema y las condiciones del ejemplo 1, nueve gallinas fueron alimentadas con un pienso que contenía 300ppm de los glicósidos de esteviol de la planta Stevia Rebaudiana (polvo con un tamaño de partícula desde 1.0mm a 5.0mm) y en una ratio de 30:70 w/w% hojas:tallos de Stevia Rebaudiana procedente de Paraguay (de la cordillera de Amambay) y otras nueve gallinas fueron alimentadas sólo con el pienso sin la composición comestible.

25 Los huevos fueron comprimidos a 5 mm/s de acuerdo con la metodología descrita en Voisley y Hunt et al. “Efecto de la velocidad de compresión sobre el comportamiento de la cáscara de huevo”, J. Agric. Engng Res. – 1969, vol. 14 (1), pp 40-46. Se determinó si los huevos podrían desafiar los 200mm/min como demostró en Ketelaerea y otro, “La medición de la fuerza de las cáscaras, de 6 diferentes cepas genéticas de gallinas ponedoras. Técnicas y comparaciones”. Fr. Vet Sci. – 2002, vol.43 (2), pp 238-44.

30 Se utilizó un texturómetro que comprime el huevo entre dos superficies paralelas en sentido ecuatorial a una distancia del 10% del diámetro inicial del huevo. Se analizaron 10 réplicas de los huevos de gallinas alimentadas con la composición comestible de la invención (muestra B) y 10 de los huevos controles (muestra A) en el análisis.

35 Siguiendo con la tabla 2, se muestra el diámetro (en mm) y “la resistencia a la rotura”

(en newtons), y la distancia de rotura (en mm) de los huevos analizados.

Tabla 2.

	Media A	Media B	t-value	p	Dev. std A	Dev. std B	F-ratio	p
D	43.7	44.2	-0.723	0.479	1.186	2.011	2.865	0.133
FB	47.9	51.7	-0.862	0.400	11.16	8.015	1.937	0.339
DB	0.421	0.397	0.771	0.451	0.077	0.0634	1.473	0.573
S	496	509	-0.686	0.501	44.84	37.17	1.455	0.585

- 5 D: diámetro ecuatorial de los huevos; FB: resistencia a la rotura; DB: distancia de rotura; S: pendiente; Dev. Std: desviación estándar.

10 Se entiende por “resistencia a la rotura” como la fuerza que debe aplicarse para la detección de la ruptura en la cáscara. La “distancia de rotura” son los milímetros que se ha reducido el diámetro ecuatorial original antes de la detección de la rotura. La pendiente es un parámetro que indica la rigidez de la cáscara. La pendiente se calcula a partir de la relación entre la resistencia a la rotura y la distancia de rotura, de tal manera que a mayor pendiente, mayor es la rigidez. Por lo tanto, una cáscara de huevo más rígida significa que la cáscara de huevo es más dura que otros que  
15 presenten un valor más bajo de S.

Los huevos del grupo B fueron ligeramente superiores que los del grupo A, con una cáscara más rígida y presentando una mayor resistencia a la rotura.

- 20 Ejemplo 2B. Efecto de la composición comestible en la productividad de gallinas (mortalidad, productividad, ingestión e índice de conversión).

25 Con el fin de demostrar los efectos de la composición comestible según la invención en gallinas productoras de huevos, se realizó un nuevo ensayo con un número más amplio de animales.

Se estudiaron 3 grupos de gallinas:

- 30 Grupo 1: 12127 gallinas de 27.5 semanas de edad, que reciben con el pienso habitual (composición del pienso del Ejemplo1) una cantidad de 300ppm de glucósidos de

esteviol de la mezcla de sólidos secos de 70:30 w/w% tallos: hojas de Stevia Rebaudiana. Es decir, la cantidad de la mezcla de sólidos secos añadida al total del pienso (composición comestible) es la que permite que haya 300ppm de glicósidos de esteviol en el pienso final.

5  
Para la preparación del pienso para el Grupo 1, cada 1000kg de pienso (composición descrita en el Ejemplo 1), contienen 560g de una mezcla de sólidos secos 70:30 w/w%, tallo:hojas de Stevia Rebaudiana. La mezcla de sólidos secos representa un 0.056 % en peso de la cantidad total del pienso (composición comestible).

10  
Grupo 2: Grupo control. 12685 gallinas de 27.5 semanas de edad que recibieron sólo el pienso sin la mezcla de sólidos secos 70:30 w/w% tallo:hojas de Stevia Rebaudiana.

15  
Grupo 3: 12122 gallinas de 27.5 semanas de edad que recibieron el pienso habitual (composición descrita en el Ejemplo 1) con una cantidad de 3000ppm de glicósidos de esteviol procedentes de la mezcla de sólidos secos 70:30 w/w% tallos:hojas de Stevia Rebaudiana. Es decir, la cantidad de la mezcla de sólidos secos añadida al total del pienso (composición comestible) es la que permite que haya 3000ppm de glicósidos de esteviol en el pienso final.

20  
Para la preparación del pienso para el Grupo 3, cada 1000Kg de pienso (composición descrita en el Ejemplo 1), contienen 5.0 Kg de una mezcla de sólidos secos 70:30 w/w%, tallo:hojas de Stevia Rebaudiana. La mezcla de sólidos secos representa un 0.5% en peso de la cantidad total del pienso (composición comestible).

25  
Las gallinas se colocaron en 3 diferentes corrales en las mismas condiciones de temperatura y humedad, los datos se recogieron diariamente. La duración del ensayo fue de un mes. El mes elegido fue junio, debido a la climatología adversa en verano, cuando la pérdida de animales es alta. También se recogieron los datos de los meses anteriores y posteriores a la realización del ensayo.

30  
Los parámetros que se evaluaron fueron: la mortalidad de las gallinas, la productividad en términos de nº total de huevos producidos por el número total de gallinas durante el mes del ensayo, la producción de huevos de categoría A, la ingestión de alimentos y el índice de conversión (IC) en términos de peso de pienso por docena de huevos.

En la mayoría de parámetros evaluados los mejores resultados se obtuvieron en el Grupo 1 (el pienso tenía incluido 300ppm de glicósidos de esteviol).

La tasa de mortalidad, expresada como porcentaje de gallinas muertas respecto del total en el momento 0, fueron los siguientes:

- Grupo 1: 0.214 %
- Grupo 2 (Control): 0.505 %
- Grupo 3: 0.346 %

Se concluye directamente de los resultados de mortalidad, que los grupos (Grupos 1 y 3) que recibieron el suplemento de glucósidos de esteviol en la cantidad adecuada de la mezcla de sólidos secos de 70:30 tallos:hojas de Stevia Rebaudiana, se mostraron menores mortalidades respecto al grupo control (Grupo 2).

Además (datos no mostrados), la tasa de mortalidad se ha mantenido, al menos por 1 mes después de agotar el consumo de pienso suplementado con Stevia en ambos grupos 1 y 3.

También se evaluó la productividad, medida como el número total de huevos producidos por el número total de gallinas durante el mes del ensayo. De acuerdo con la bibliografía consultada, la productividad óptima para las gallinas de 27.5 semanas está comprendida entre el 90-95%.

Los datos obtenidos para el mes del análisis fueron los siguientes:

- Grupo 1: 91.46 %
- Grupo 2: 86.97 %
- Grupo 3: 87.73 %

Como se puede observar a partir de los datos anteriores, sólo las gallinas del grupo 1 mantienen la productividad dentro de un valor óptimo, mientras que el mes de mayo (el anterior a la prueba) todos los grupos estaban en el rango de productividad óptimo (datos no mostrados). En el grupo 3 se observa un valor ligeramente inferior al requerido como óptimo de productividad.

Además, el grupo 1 mantiene la productividad óptima de los meses posteriores a la prueba (julio) mientras que la de los otros grupos se mantuvo entre el 85-90%. Estos

datos permiten concluir que una cantidad de 300ppm de glucósidos de esteviol incluida como la mezcla de sólidos secos de Stevia Rebaudiana en una proporción de 70:30 w/w% de tallos:hojas, es de particular interés para mantener la productividad durante un período crítico del año como es el verano, en el que debido a las altas temperaturas, las gallinas bajan su productividad. La productividad está definida como la relación entre número de huevos puestos y población de gallinas.

Analizando la producción de huevos de categoría A, los resultados obtenidos son los siguientes:

- 10- Grupo 1: 321500 huevos (96.74 % del total de huevos producidos por el Grupo 1)
- Grupo 2: 317580 huevos (96.71% del total de huevos producidos por el Grupo 2).
- Grupo 3: 307880 huevos (96.17 % del total de huevos producidos por el Grupo 3)

El porcentaje de huevos perdidos por rotura fue:

- Grupo 1: 0.68%
- Grupo 2: 0.97 %
- 20- Grupo 3: 0.88 %

Estos datos indican que el Grupo 1 produjo un 0.59% más de huevos de categoría A (17.186 huevos adicionales). También la pérdida debido a la ruptura fue destacablemente menor en los Grupos 1 y 3 respecto al control (Grupo 2). La cantidad de huevos rotos en el Grupo 1 fue un 29.90 % inferior a la cantidad de huevos rotos en el Grupo 2.

U.S. Los huevos de categoría A tienen características muy similares a los de categoría AA, excepto por las claras, que son más firmes. Los huevos de esta clase son los que se venden más frecuentemente en los comercios. Los huevos de clase AA tienen las claras más gruesas y firmes, las yemas son redondeadas y elevadas, prácticamente libres de defectos, con una cáscara uniforme y lisa. Los huevos de clase A y AA son los mejores para freír y para escaldar, ya que para este tipo de cocción es importante el aspecto.

35 Por lo que respecta a la ingestión de pienso (consumo) en gramos por día (g/día) los

resultados fueron los siguientes:

- Grupo 1: 119.15 g/día
- Grupo 2: 112.12 g/día
- Grupo 3: 121.20 g/día

5 Durante el mes de la prueba, los Grupos 1 y 3 habían ingerido más pienso que el control (Grupo 2). Sin embargo, los datos de productividad y otros parámetros compensan esta mayor ingesta de alimentos.

10 Durante los meses anterior y posterior al ensayo (Mayo y Julio), el consumo de pienso fue similar en los tres grupos.

Otro parámetro evaluado fue el índice de conversión (IC), definido como el peso de pienso consumido por docena de huevos producidos. Los valores observados en los tres grupos fueron los siguientes:

- Grupo 1: 1.45 Kg pienso consumido/docena huevos
- Grupo 2: 1.44 Kg pienso consumido/docena huevos
- Grupo 3: 1.56 Kg pienso consumido/docena huevos

20 Teniendo en cuenta los valores obtenidos de IC, se estableció que el grupo con el suplemento de Stevia Rebaudiana en el pienso que había sido más eficiente fue el Grupo 1, ya que el IC en relación con el Grupo 3 fue similar y la cantidad de mezcla de sólidos secos (Stevia Rebaudiana) contenidos en la composición comestible (pienso) fue menor en el Grupo 1 que en el Grupo 3.

25 Esta eficiencia es, además, corroborada con los valores de los datos de productividad (Grupo 1 = 91.46% y Grupo 3 = 87.73%).

30 Sin embargo, un pienso composición conteniendo 3000pppm de glucósidos de esteviol aún sigue siendo de interés teniendo en cuenta los resultados de todos los parámetros en su conjunto.

35 Aunque los datos no se incluyen, durante el mes del ensayo se evaluó también el efecto sobre la rigidez de la cáscara del huevo (como en el Ejemplo 2A), y la coloración de la yema de huevo (como en el Ejemplo 1).

En cuanto a la rigidez de la cáscara, los dos grupos que recibieron el composición comestible conteniendo 300 o 3000ppm de la mezcla de Stevia Rebaudiana 70:30 w/w% (tallos:hojas), mostraron valores de fuerza para romper la cáscara más altos que los del grupo control (Grupo 2). Estos valores de resistencia a la ruptura fueron más altos durante todo el periodo que duró el ensayo en el Grupo 1 y el Grupo 3, frente a una resistencia menor en el Grupo 2.

En relación con la coloración de la yema del huevo, en el Grupo 1 y Grupo 3, se apreció un mayor brillo y un tono amarillo más intenso de la yema que el de los huevos pertenecientes al Grupo 2. La intensidad del brillo de la yema del huevo es un indicador del estado de salud de las gallinas.

Todos los datos recuperados de este ejemplo 2B, debido al gran tamaño de la muestra de gallinas, permite obtener valores significativos, muestran que el composición comestible de la invención reduce el estrés de las gallinas en el sistema productivo, evitando así la inhibición del desarrollo o la disminución de la productividad provocada por el estrés.

El composición comestible conteniendo una cantidad adecuada de Stevia Rebaudiana con una concentración de glucósidos de esteviol entre 150ppm a 3000ppm mejora la salud de las aves de corral y reduce su mortalidad. La ingestión de pienso, además, se incrementa sin comprometer el índice de conversión (IC). La Stevia Rebaudiana consiste en un composición de sólidos secos procedentes de hojas y tallos de la planta en una proporción de 25:75 al 35:65 w/w%, preferiblemente 30:70 w/w%.

### Ejemplo 3. Un alimento para cerdos.

A 490 Kg de pienso típico para lechón (ver más abajo en la tabla 3) se han añadido 5Kg del composición comestible de la invención. Así, el pienso contenía un 1.0% del composición comestible de la invención. Para la elaboración de los 5kg de composición comestible, 3.5kg de tallo de Stevia previamente desecado y reducido a polvo y 1.5kg de hojas secas de Stevia también reducidas a polvo, se mezclaron y se añadieron al pienso. El pienso formado entonces contenía un 0.7% en peso de los tallos y el 0.3% en peso de las hojas, que da lugar a 3000ppm de glicósidos de esteviol. La Stevia Rebaudiana es originaria de Paraguay (de la cordillera de Amambay).

Con el fin de determinar la concentración de glucósidos de esteviol (ppm) en las hojas y tallos de la Stevia Rebaudiana, se realizaron varios análisis por HPLC de estas partes de la planta. Para las hojas se determinó que a partir de 10 microlitros de muestra (de hojas), 5 mg de Stevia Rebaudiana tenían la siguiente distribución porcentual: rebaudiósido A (31.15%), esteviósido (56.22%), rebaudiósido F (1.05%), rebaudiósido C (5.88%), dulcósido A (2.32%), se aisló un composición no identificado con un peso molecular de 804g/mol; MW804 (1.02%), rubusósido (1.25%) y rebaudiósido B (1.11%).

El análisis por HPLC se realizó con dos columnas (C18 Alltima Alltech, 4.6MM de diámetro x 25 cm de largo y 5 micrómetros de tamaño de partícula) colocadas en una distribución en serio. La fase móvil fue acetonitrilo / agua en una proporción de 35/65. La detección se realizó por U a 210nm.

Previamente, se preparó la muestra por molturación de las hojas y secado posterior a 105°C durante 2horas. Se pesó 0.5g de polvo molturado y se disolvió con 30ml de agua hirviendo durante 10min en tubo cerrado. Dicho tubo se llevó a centrifugación, refrigeración y dos etapas de extracción adicional con 30ml de agua hirviendo. Los sobrenadantes de cada centrifugación de los extractos, previamente enfriados, se reunieron y una alícuota se utilizó para el análisis por HPLC.

Para el tallo: el mismo análisis pero con 10 microlitros de un extracto del tallo de la planta, dio la siguiente distribución porcentual: rebaudiósido A (30.32%), esteviósido (54.06%), rebaudiósido F (1.21%), rebaudiósido C (6.94%), dulcósido A (3.26%), se aisló un composición no identificado con un peso molecular de 804g/mol; MW804 (0.68%), rubusósido (0.78%) y rebaudiósido B (2.75%).

El análisis por HPLC de los tallos se llevó a cabo con el mismo procedimiento que para el análisis de las hojas.

Una vez que la concentración de glucósidos de esteviol se determina en las hojas y los tallos, la cantidad de mezcla de sólidos secos que comprenden las hojas y tallos de la Stevia Rebaudiana se calcula para proporcionar en el pienso final (composición comestible) las partes deseadas por millón (ppm) de estos glucósidos.

Ejemplo 4. Ensayo en lechones lactantes. Determinación de las proporciones de hojas

y tallos de la planta Stevia Rebaudiana que se utiliza en el composición comestible.

El objetivo de este ensayo es demostrar que los lechones alimentados con Stevia Rebaudiana mostraron un mayor crecimiento y mejores índices de conversión (kg de consumo de alimento/kg obtenido por los animales) que el grupo control.

Entre los temas de mayor valor en el trabajo de investigación, fue determinar cuál es la cantidad más adecuada de Stevia Rebaudiana, así como la proporción de tallos y hojas. Por lo tanto, se utilizaron diferentes proporciones de tallos y hojas. Es importante señalar que el porcentaje de esteviósido y el rebaudiósido (o la Stevia en general) es mayor en la hoja que en el tallo, siendo de interés para la mejora organoléptica del pienso. Sin embargo, se ha sugerido la presencia de principios activos con actividad antiséptica en el tallo. Estas sustancias pueden tener un potencial interesante en el crecimiento de los animales, gracias a la modulación de la flora intestinal. Mejorarlos, por ejemplo, mediante el aumento de la concentración de LAB (bacterias de ácido láctico) y la reducción de la presencia de otros grupos y géneros nocivos, como los coliformes, pueden conducir a una reducción en la concentración de TNF-alfa. Este hecho es beneficioso para el desarrollo del organismo, ya que las altas concentraciones de la misma, puede producir la inhibición del desarrollo por estrés fisiológico.

Con todas estas premisas, los ensayos experimentales que se realizaron fueron los siguientes:

T1: Control negativo (NC). Dieta basal + alfalfa seca al 2 % (es decir 10 kg/ 500 Kg. pienso).

T2: NC + tallo Stevia al 1.8% + hoja Stevia al 0.2 % (es decir, 9 Kg + 1 Kg / 500 Kg pienso)

T3: NC + tallo Stevia al 1.4% + hoja Stevia al 0.6 % (es decir 7 Kg + 3 Kg / 500 Kg pienso)

T4: NC + tallo Stevia al 1.0% + hoja Stevia al 1.0 % (es decir, 5 Kg + 5 Kg / 500 Kg pienso)

T5: Control positivo. Dieta basal + alfalfa seca al 2 % (es decir 10 kg/500 Kg. pienso) + CuSO<sub>4</sub> 140 ppm (40 g/500 Kg alimento).

Todas las dietas eran idénticas en su composición, y se han añadido los productos experimentales a dicha dieta basal. Stevia Rebaudiana procedía de Paraguay

(cordillera de Amambay).

Los lechones fueron alojados en treinta corrales de cuatro animales cada uno. Los animales fueron distribuidos al azar por el peso inicial en seis bloques. Cada bloque de 5 por lo tanto, formado por cinco corrales. Dentro de cada bloque, se asignó al azar uno de los cinco tratamientos a cada uno de los corrales.

El ensayo se realizó durante 42 días y los lechones se pesaron al inicio, a los 14 días y al final del experimento (42 días). Se calculó el peso corporal inicial y final, incremento diario de peso, consumo de alimento y índice de conversión alimentaria.

La tabla 3 muestra la composición en porcentaje en peso (5) de la dieta basal.

Tabla 3. Composición de las dietas basales (%)

Ingredientes	pre-starter (de 0 a 21 días post-destete)	starter (desde día 21 post-destete hasta aprox. 20 Kg de peso)
Trigo	25.00	14.00
Cebada	20.00	27.00
Maíz	15.00	19.15
Suero de leche dulce	10.00	5.14
Harina de soja 48	8.20	19.62
Soja extruida	7.25	-
Harina de trigo	4.00	5.73
Concentrado de proteína de patata	2.62	-
Plasma porcino seco por pulverización	1.25	1.25
Manteca de cerdo	3.50	4.71
Fosfato dicálcico	1.51	1.62
Carbonato de calcio	0.21	0.48
Sal	0.17	0.26
L-Lisina-HCl	0.49	0.39
L-Treonina	0.16	0.12
DL-Metionina	0.19	0.14
L-Triptofano	0.05	-
Vit Min complex	0.40	0.40

En la tabla 4 se indican los parámetros productivos de los animales entre los días 0-42 del experimento-

5 Tabla 4. Parámetros productivos .

	Peso inicial (Kg)	Peso final (Kg)	Ganancia peso diaria (g)	Consumo pienso diario (g)	Ratio alimentación / ganancia	Ratio ganancia/ alimentación (FCR)
T-2	6.47	20.37	331	515	1.56	0.64
T-3	6.48	21.32	353	531	1.52	0.66
T-4	6.46	20.96	345	520	1.51	0.66

10 La ratio alimentación / ganancia y la ratio ganancia / alimentación (FCR) son parámetros que indican la relación entre el aumento de peso diario y el pienso diario ingerido. La ratio alimentación / ganancia indica la relación entre el consumo de pienso en relación con el aumento de peso del animal (en g o kg). Pero, un valor por encima de 1 indica que el consumo por animal (en gramos o kg de pienso) es mayor que el aumento de peso por animal. La ratio ganancia alimentación o FCR es la ganancia de peso del animal por el peso del pienso.

15 La siguiente tabla 5 muestra la ganancia de peso corporal y el peso de los animales que recibieron los compuestos experimentales que contienen Stevia Rebaudiana.

Tabla 5. De peso corporal y el aumento de peso de animales calculado animal por animal.

	Peso corporal día 14 (Kg)	Peso corporal día 42 (Kg)	Ganancia peso diario (días 0-14) (g)	Ganancia peso diario (días 15-42) (g)	Ganancia peso diario (días 0-42) (g)
T2	8.90	20.26	175	406	329
T3	9.16	21.09	194	426	349
T4	9.13	20.94	192	422	345

20 A partir de los datos de las Tablas 4 y 5, se deduce que el tratamiento T2 parecía tener una ingesta de pienso y un aumento de peso menor que los tratamientos T3 y T4. Es probable que esto se deba a la fracción superior de tallo de Stevia en este tratamiento

T2. Los mejores resultados se obtuvieron con el tratamiento T3, en el que se complementa la dieta basal con Stevia Rebaudiana, que comprende un 30% de la hoja de la planta y el 70% del tallo de la planta. En todos los tratamientos T2 a T5 la cantidad de mezcla de sólidos secos de la planta Stevia Rebaudiana (hojas y tallos) representa el 2% en peso de la composición total de composición comestible.

Ejemplo 5. Prueba de preferencia. Ensayo comparativo.

En este caso, se llevó a cabo una prueba de preferencia de los cerdos con pienso suplementados con diferentes concentraciones de Stevia Rebaudiana.

En este sentido, se determinaron las partes por millón de esteviósidos y rebaudiósidos aceptables que están presentes en el composición comestible. Para hallar los valores de ppm presentes en la muestra de tallos y hojas de Stevia se utilizó la técnica por HPLC detallada anteriormente en el ejemplo 3. En esta prueba de preferencia sólo se usó fragmento de hoja.

Otro objetivo de esta prueba fue la realización de un ensayo comparativo entre un pienso suplementado con 150ppm de glicósidos de esteviol y otro con 150ppm de sacarina. La razón del uso de sacarina como control comparativo es para verificar que la Stevia tiene un gran poder edulcorante.

La prueba fue realizada con los siguientes pasos:

Destete: Control de cerdos desde los 7-8kg de peso hasta 10kg.

Animales: Machos de la raza Pietrain y hembras reproductoras mitad raza (Large White x Landrace) mitad raza Landrace

Número de animales: 120 animales de una única procedencia, obtenidas a partir del trabajo sincronizado de 10 cerdas.

Tratamiento: 5 simultáneamente

Días de engorde: 2 semanas

Estación experimental:

Las pruebas se realizaron en un local con 12 corrales (10 en la prueba y dos enfermerías). El suelo del corral estaba formada por lamas de plástico en su totalidad.

5 Cada corral tiene dos tolvas de pienso (cada uno con las dietas control y tratamiento), donde se administró la alimentación manual, 4 veces al día, y cada corral tenía un abrevadero.

Pienso y agua:

10 Antes de iniciar cualquier prueba, se realizó un análisis completo de los diferentes tipos de pienso para asegurar que correspondían a la fórmula y que cumplían con las condiciones microbiológicas adecuadas. Se fabricaron 2000 kg de pienso.

15 La tabla 6 muestra la composición del pienso para los lechones.

Tabla 6. Composición del pienso en % en peso

Ingrediente	%
maíz	40,00
cebada	19,39
“soycomil”	12,50
Suero duce	10,12
enersoy 3600	6,25
s reeng 50%	5,39
wpc35	2,73
Ne-20 Lacto/prest	2,00
Fosfato dicálcico	0,53
L-Lisine solid 99%	0,42
Cloruro de sodio	0,20
Metionina en polvo	0,17
Treonina	0,13
valina	0,10
L-triptófano 98%	0,06

Diseño experimental:

20

Distribución del pienso: ad libitum de acuerdo a la prueba, dando la alimentación manual.

5 Se pesó a todos los animales juntos al inicio (día 0), el séptimo día (7) y el catorceavo (14) para analizar el peso medio. Después, los animales se separaron en lechones gordos y delgados. El mismo día se valoró el consumo de alimento, separando el consumo control (grupo control) de los que consumían Stevia (con los que consumían el pienso con el suplemento de Stevia Rebaudiana).

10 Al final del ensayo se calculó el porcentaje de pienso rechazado que contenía Stevia.

La tabla 7 muestra la evolución del peso (en kg) de los lechones que se alimentan con pienso suplementado con sacarina o comparativamente con hojas de Stevia con 75ppm, 150ppm, 300ppm, 600ppm o 1500ppm.

15

Tabla 7.

Concentración glucósido esteviol / sacarina (ppm)	Peso (Kg) día 0	Peso (Kg) día 7	Peso (Kg) día 14
75 (comparativo)	8.15	9.14	10.99
150	8.17	9.89	12.43
300	7.88	9.84	12.33
600	7.89	8.78	10.43
1500	7.87	9.18	11.35

Los animales, durante el ensayo, pudieron elegir entre el composición comestible con sacarina o composición comestible con Stevia.

20

25

Tabla 8. Pienso ingerido.

Concentración glicósido de esteviol / sacarina (ppm)	Consumo pienso (g) días 0-7 (Stevia)	Consumo pienso (g) días 0-7 (control)	Consumo pienso (g) días 7-14 (Stevia)	Consumo pienso (g) días 7-14 (control)	TOTAL (Stevia)	TOTAL (control)
75 (comparativo)	1050.00	1428.00	2884.00	2653.00	3934.00	4081.00
150	1326.50	1522.50	3202.50	2747.50	4529.00	4270.00
300	1725.50	1774.50	2754.50	2775.50	4480.00	4550.00
600	1074.50	1484.00	2628.50	2702.00	3703.00	4186.00
1500	1326.50	1697.50	2684.50	2726.50	4011.00	4424.00

De las tablas 7 y 8 se concluye que los animales consumen la misma cantidad de pienso conteniendo Stevia a una concentración de 150ppm y 300ppm que del pienso conteniendo sacarina.

Los mejores índices de producción, crecimiento y consumo de pienso, se consiguen cuando los glucósidos de esteviol están presentes a una concentración entre 150ppm y 300ppm.

Es importante tener en cuenta que la cantidad de glucósidos de esteviol respecto al peso final del pienso, favorecen una buena productividad (evolución del peso, lo cual significa producción de carne), pero no compromete las propiedades organolépticas del pienso.

Sería interesante examinar específicamente los animales cuando sólo tuvieran acceso al pienso que contiene Stevia para poder analizar las propiedades organolépticas y el posible mejor aprovechamiento del pienso suministrado.

Ejemplo 6. Ensayo de preferencia con pienso que contiene componentes de la planta Stevia Rebaudiana en proporción 30:70 (hoja:tallo).

Una vez realizado el ensayo del ejemplo 5 con el fin de determinar la preferencia por un pienso suplementado con Stevia Rebaudiana a diferentes concentraciones, se realizó un nuevo ensayo incluyendo en la composición comestible de pienso las

mismas concentraciones de glucósidos de esteviol, proporcionándose dichas concentraciones por un componente de la planta Stevia Rebaudiana, con un 30% en peso de hojas y un 70% en peso de tallos. Esta proporción es la mejor, tal como se ilustra en el ejemplo 4.

5 El uso del fragmento de hojas y tallos de Stevia Rebaudiana, no sólo tiene la ventaja económica de hacer buen uso de la planta entera, sino que también representa una distribución de fibra adicional que es buena para los animales.

10 La prueba fue realizada con los siguientes pasos:

Destete: Control de cerdos desde los 7-8k g de peso hasta los 10kg.

15 Animales: Machos de la raza Pietrain y hembras reproductoras mitad raza (Large White x Landrace) mitad raza Landrace

Número de animales: 120 animales de una única procedencia obtenidas a partir del trabajo sincronizado de 10 cerdas.

20 Tratamiento: 5 simultáneamente

Días de engorde: 15 días

Estación experimental:

25 Las pruebas se realizaron en un local con 12 corrales (10 en la prueba y dos enfermerías). El suelo del corral estaba formado por lamas de plástico en su totalidad. Cada corral tiene dos tolvas de pienso (cada uno con las dietas control y tratamiento), donde se administró la alimentación manual, 4 veces al día, y cada corral tenía un  
30 abrevadero.

Pienso y agua:

35 Antes de iniciar cualquier prueba, se realizó un análisis completo de los diferentes tipos de pienso para asegurar que correspondían a la fórmula y que cumplían con las condiciones microbiológicas adecuadas. Se fabricaron 2000kg de pienso.

Los cinco tratamientos con Stevia (70:30 w/w tallo:hojas) fueron los siguientes:

Tratamiento 1 - 75 ppm (comparativo): 98 gramos de tallos y 42 gramos de hojas

5 Tratamiento 2 - 150 ppm: 197 gramos de tallos y 84 gramos de hojas

Tratamiento 3 - 300 ppm: 394 gramos de tallos y 168 gramos de hojas

Tratamiento 4 - 600 ppm: 788 gramos de tallos y 338 gramos de hojas

Tratamiento 5 - 1500 ppm: 1969 gramos de tallos y 844 gramos de hojas

10 Son los mismos tratamientos mencionados en la tabla 6 del ejemplo 5.

Diseño experimental:

15 Distribución del pienso: ad libitum de acuerdo a la prueba, dando la alimentación manual.

Controles a realizar:

20 - Medición del peso de los lechones mediante la agrupación de los animales de un corral (12 animales) en el día del destete (0), en el día 7 y en el día 14 de tratamiento respectivamente.

- Consumo débil de alimento (cada una corresponde a los animales agrupados en un corral).

25 Los animales fueron pesados en conjunto los días 0, 7 y 14 para analizar el peso medio. Entonces los animales fueron separados entre pesados y ligeros. El mismo día fue estimado el consumo de pienso por separación del pienso control del pienso suplementado con Stevia Rebaudiana.

30 Al final del ensayo se calculó el porcentaje de pienso rechazado que contenía Stevia.

35 La tabla 9 indica la evolución del peso de los lechones alimentados con pienso suplementado con una mezcla definida de tallos y hojas de Stevia conteniendo 75 ppm (tratamiento 1), 150 ppm (tratamiento 2), 300 ppm (tratamiento 3), 600 ppm (tratamiento 4), 1500 ppm (tratamiento 5) frente a un pienso control suplementado con sacarina.

Tabla 9.

Concentración glicósidos esteviol / sacarina (ppm)	Peso (Kg) día 0	Peso (Kg) día 7	Peso (Kg) día 14
75 (comparativo)	7.19	8.45	11.49
150	7.48	8.14	11.21
300	6.85	8.03	11.03
600	7.35	8.00	11.24
1500	6.52	8.23	11.46

Los animales crecieron con un libre acceso al pienso control con sacarina y al pienso suplementado con Stevia correspondiente a cada tratamiento.

5 La tabla 10a muestra los gramos de pienso con sacarina (control) y con la composición comestible objeto de la invención, ingeridos por los lechones y separados según su peso considerado ligero o pesado (L-ligero, H-pesado).

10 Tabla 10a. Ingestión de pienso.

Concentración glicósidos esteviol / sacarina (ppm)	Ingestión pienso (g) 0-7 días (Stevia)	Ingestión pienso (g) 0-7 días (control)	Ingestión pienso (g) 7-14 días (Stevia)	Ingestión pienso (g) 7-14 días (control)
L 75 (comparativo)	954	923	2062	1892
H 75	1492	1431	2708	2708
L150	867	750	1650	1667
H 150	1300	1083	3017	3100
L 300	1100	1033	2055	2164
H 300	1323	1308	2569	2446
L 600	877	985	2618	2309
H 600	1277	1277	2569	2477
L 1500	1133	1067	2400	2545
H 1500	1138	1077	2231	2200

En la tabla 10b se indican los gramos de pienso con sacarina (control) y con la

composición comestible de la invención (Stevia), ingerida durante el ensayo. Los valores son la media de consumo de animales ligeros y animales pesados.

Tabla 10b. Promedio de pienso ingerido.

5

Concentración glicósidos esteviol / sacarina (ppm)	Ingestión pienso (g) días 0-7 (Stevia)	Ingestión pienso (g) días 0-7 (control)	Ingestión pienso (g) días 7-14 (Stevia)	Ingestión pienso (g) días 7-14 (control)	TOTAL (Stevia)	TOTAL (control)
75 (comparativo)	1223.00	1177.00	2385.00	2300.00	3608.00	3477.00
150	1083.50	916.50	2333.50	2383.50	3417.00	3300.00
300	1211.50	1170.50	2312.00	2305.00	3523.50	3475.50
600	1077.00	1131.00	2593.50	2393.00	3670.50	3524.00
1500	1135.50	1072.00	2315.50	2372.50	3451.00	3444.50

En la FIG. 1 se indica esquemáticamente el pienso ingerido (I) de composición comestible suplementado con Stevia, y el crecimiento (G) de los lechones durante las dos semanas de tratamiento. Para el crecimiento (G) en gramos (representado en la derecha por el eje de Y), los valores para la primera semana (1W) están representados por la parte clara de las barras y los valores de la segunda semana (2W) está representado por la parte oscura de las barras. Los datos para los animales de menor peso (L) y los animales de mayor peso están representados para cada concentración de Stevia. Las líneas enlazadas representan la ingestión global de pienso (I) (reproduciendo los valores de pienso ingerido en la tabla 10) y los valores numéricos en gramos se representan en el eje izquierdo (I), la línea negra es de control (C) y la línea gris es del grupo Stevia (S). Lxx significa animales de peso ligero que han recibido xx ppm de pienso suplementado con sacarina o con Stevia (por ejemplo L75 significa que los animales recibieron pienso suplementado con 75 ppm de sacarina o con 75ppm de Stevia. Hxx significa los animales de mayor peso que recibieron pienso suplementado con 75ppm de sacarina o con 75ppm de Stevia.

Por otro lado, en la FIG. 2 está indicado el (%) porcentaje de preferencia del pienso suplementado con Stevia respecto al pienso control consumido por los animales. La línea negra indica los valores de la primera semana (1W), la línea gris oscura indica los

valores de la segunda semana (2W) y la línea discontinua representa la media de las dos semanas (MW). Los valores indicados en la FIG. 2 representan el porcentaje (%) de cada pienso con Stevia respecto al pienso control (sacarina) consumido por los animales. El 50% significa que ambos piensos fueron comidos por igual. Un valor por encima del 50% indica que los animales consumieron pienso con Stevia en mayor cantidad respecto al control. 75ppm, 150ppm, 300ppm, 600ppm y 1500ppm son las concentraciones de glicósidos de esteviol o sacarina contenidos en el pienso.

Se aprecia que los valores globales de las dos primeras semanas para ambos subgrupos (pesados y ligeros), la preferencia por el pienso suplementado con sacarina es al menos igual que el del pienso suplementado con Stevia y en algún caso, mayor.

La inclusión de los tallos en la mezcla de la composición comestible proporciona una mayor digestibilidad y utilización de los nutrientes, hecho que puede considerarse un factor influyente en el crecimiento, así como los valores obtenidos del consumo. Este hecho también se apoya en los interesantes valores obtenidos en el grupo suplementado con 1500 ppm, ya que el ensayo anterior utilizando sólo el fragmento de hojas de Stevia no refleja esta posibilidad (ejemplo 5). Una vez más, se pone de manifiesto la importancia de la mezcla de hojas y tallos en la mezcla de sólidos secos de Stevia Rebaudiana para lograr el efecto deseado. Ambos parámetros facilitan el efecto deseado (aumento de la productividad) sin comprometer el sabor de la composición comestible para los animales.

Además del efecto edulcorante de Stevia Rebaudiana, a la vista de estos resultados, el mecanismo de trabajo de la misma se ha convertido en una prioridad en los objetivos del inventor.

Por otra parte, teniendo en cuenta las cuestiones económicas, el valor más interesante de suplementación de la composición comestible, fue el de 300ppm. Esta concentración de glicósidos de esteviol, se utiliza en el siguiente Ejemplo 7 para la determinación de la mejora de la productividad animal.

Ejemplo 7. Efecto de la composición comestible sobre el índice de conversión alimenticio (FCR). Datos de productividad.

El siguiente ensayo se llevó a cabo para comprobar si en la fase de destete de los

lechones, la Stevia Rebaudiana (y especialmente a concentración de 300ppm de glicósidos de esteviol) era capaz de mejorar los ratios de crecimiento.

Características del ensayo:

5

Período de destete: control de los lechones entre 7.6 y 20kg.

Animales: Machos híbridos de la raza Pietrain y hembras reproductoras mitad raza (Large White x Landrace) mitad raza Landrace.

10

Número de animales: 154 animales de una misma procedencia (obtenidos por el trabajo sincronizado de 12 cerdas)

Tratamiento: 3 simultáneos

15

Días de engorde: 42 días

Estación experimental:

Las pruebas se realizaron en una granja de 12 corrales. El suelo de los mismos estaba cubierto por lamas de plástico en su totalidad.

20

Pienso y agua:

Se fabricaron 6000kg de pienso, que se sometieron a un análisis exhaustivo para verificar su contenido en glicósidos de esteviol y las condiciones microbiológicas del mismo. La incorporación de Stevia se realiza en una proporción hoja: tallo 30:70.

25

Tratamiento de 300ppm: pienso suplementado con 394 gramos de tallo Y 169 gramos de hoja. (70:30 w/w % de tallos y hojas).

30

Tratamiento de 3000ppm: pienso suplementado con 3938 gramos de tallo y 1688 gramos de hojas (70:30 w/w % de tallos y hojas).

Control: pienso sin suplemento de glicósidos de esteviol de Stevia Rebaudiana.

Los piensos suplementados con Stevia fueron los mismos que los mencionados en la Tabla 6 del Ejemplo 5, citado anteriormente. Stevia Rebaudiana procedente de la cordillera de Amambay de Paraguay.

5 Diseño experimental:

Distribución de la alimentación: Ad libitum de acuerdo a la prueba, manualmente.

Controles a realizar:

- 10
- Identificación individual de los lechones el día del destete.
  - Pesada de los lechones agrupados por corral (13 animales) desde el día del destete (0), y los días 7, 14, 21, 28, 35 y 42 de tratamiento respectivamente.
  - Pesada individual de los lechones al día del destete (0) y los días 21 y 42 de acuerdo con las pautas de alimentación coincidentes con los cambios en el pienso.
  - 15 - Consumo débil de alimento por tolva (correspondiente a los animales agrupados en un patio (13 animales)).

El cuadro 11 muestra el peso inicial medio (IW) en gramos de los lechones (peso por grupo), la media del aumento de peso (DMG) en gramos de 0 a 21 días, de 21 a 42 días, el global del día 0 al día 42 del ensayo; y la media diaria del pienso ingerido (DMI) en gramos de 0 a 21 días, de 21 a 42 días y el global de 0 a 42 días. La tasa de conversión alimenticia (FCR) también está indicada del día 0 al 21, de 21 a 42 días y el global del día 0 al día 42 del ensayo.

25 Tabla 11. Datos de pesaje en grupo

	IW	DMG días 0-21	DMI días 0-21	FCR días 0-21	DMG días 21- 42	DMI días 21- 42	FCR días 21- 42	DMG días 0-42	DMI días 0-42	FCR días 0-42
T3000	6.72	195	279	1.434	458	696	1.520	327	488	1.494
T300	6.89	198	294	1.485	444	695	1.566	321	495	1.541
Control	6.85	163	256	1.573	422	662	1.570	292	459	1.571

La siguiente Tabla 12 muestra los datos del pesaje individual (valores medios). Es decir, se indica la media diaria de ganancia de peso (DMG) en gramos de 0 a 21 días, de 21 a 42 días y el global del ensayo de 0 a 42 días.

Tabla 12. Datos de pesaje individual

	IW	DMG Días 0-21	DMG Días 21-42	DMG Días 0-42
T3000	6.82	199	446	322
T300	6.96	204	458	331
Control	6.88	173	415	294

De los cuadros 11 y 12 se concluye que los lechones alimentados con pienso suplementado con Stevia Rebaudiana consumen más que los lechones alimentados con pienso control y también se observa una mejora en la conversión alimenticia. Esta mejora es mejor a medida que aumenta la inclusión de Stevia Rebaudiana.

El consumo observado en los lechones alimentados con el pienso control es 459 gramos por día, mientras que en los lechones alimentados con Stevia el consumo observado es de 495 gramos por día (300ppm) y 487 gramos por día (3000ppm). Este aumento en el consumo se puede ver tanto en la primera fase (0-21 días) como en la segunda fase (21-42 días) de la prueba.

Por otra parte, se deduce que la mejora en el índice de conversión con la inclusión de Stevia es mayor a medida que mayor es la cantidad en el pienso, es decir, la tasa de mejora con 50 gramos con el tratamiento con 300ppm de glicósidos de esteviol y de 80 gramos con 3000ppm de glicósidos de esteviol. Esta mejora se detectó especialmente en la primera fase del ensayo, cuando los lechones son jóvenes y el destete representa un periodo de gran estrés para ellos.

El aumento del consumo y la mejora de la conversión alimenticia implican que el crecimiento de los lechones es mayor cuando son alimentados con piensos (pienso) suplementados con Stevia. Mientras que los lechones del control negativo crecieron 294 gramos por día, los lechones complementados con Stevia, crecieron 331 gramos por día (300ppm) y 322 gramos por día (3000ppm). Esta diferencia en el crecimiento es importante para el tratamiento de 300ppm ( $p=0.035$ ) y también se observa una tendencia al alza para el tratamiento de 3000ppm ( $p=0.089$ )

Esquemáticamente, el alimento suplementado con 300ppm de glicósidos de esteviol mostraron niveles mayores de crecimiento en comparación con el control negativo. Sin embargo, la diferencia en gramos entre este alimento y la complementada con

3000ppm no es muy alta (9 gramos) y se ha observado que cuanto mayor sea la cantidad de Stevia Rebaudiana (en ppm de glicósidos de esteviol), mejor será la tasa de conversión.

5 En un ensayo adicional realizado en los lechones, se detectó que las heces de los animales que comieron el pienso con la composición comestible según la invención, es decir, los de la T300 y T3000, presentaron una disminución en el crecimiento de bacterias coliformes de aproximadamente un logaritmo (disminución del 90%). Por otro lado, también se observó un aumento de 10 veces el recuento de bacterias ácido-  
10 lácticas (LAB). Este es un punto interesante, ya que implica una mejora en la sanidad ganadera y la reducción de las posibilidades de infección. Por otra parte, este patrón microbiótico permite reducir la concentración de TNF- $\alpha$ , lo que reduce el estrés fisiológico. Un estudio paralelo con el objetivo de detectar la capacidad fermentativa de algunos LAB para fermentar las fibras de Stevia reveló que Streptococcus salivarius  
15 tiene un gran poder de fermentación para fermentar las fibras de Stevia Rebaudiana, es decir, las hojas de la planta. Por tanto, se concluye que la Stevia Rebaudiana es un buen prebiótico que mejora la acción de las bacterias beneficiosas en el tracto intestinal de los animales, tales como Streptococcus salivarius. Un prebiótico es un ingrediente de la alimentación no digerible que estimula el crecimiento y/o la actividad  
20 de las bacterias en el sistema digestivo con efecto beneficioso para la salud del organismo. Ejemplos de prebióticos incluyen hidratos de carbono en forma de fibra. La invención proporciona evidencia de que la composición comestible de la invención actúa como prebiótico cuando se administra en un pienso. Este efecto adicional es otra de las características positivas de la composición comestible de la invención, lo que  
25 significa un valor añadido en el campo de los productos de alimentación animal.

#### Ejemplo 8. Efecto de la mezcla de Stevia Rebaudiana en cerdos lactantes.

30 A fin de probar otros parámetros relacionados con la mejora de la productividad, se realizó otro ensayo en cerdas embarazadas y lactantes.

Diferentes cerdas fueron estudiadas. Algunas cerdas (n=15) recibieron un pienso para cerdos comunes (Grupo 0 o control) y las cerdas de la prueba (n=12, Grupo 1) recibieron el pienso complementado con 300ppm de glicósidos de esteviol  
35 procedentes de la Stevia (mezcla de sólidos desecados) en una proporción (30:70) 30% y 70% en peso de hojas y tallos respectivamente.

5 Para la preparación del pienso para el Grupo 1, a 1000kg de pienso común se le añadieron 560 gramos de una mezcla de sólidos secos 70:30 w/w% tallo: hojas de Stevia Rebaudiana. La mezcla de sólidos secos corresponde a un 0.056% de la cantidad total del pienso (composición comestible).

Grupo 1. Recibió el pienso al final de la gestación y durante el periodo de lactancia.

10 Los parámetros productivos evaluados fueron: a) variación del peso de las cerdas, y b) crecimiento de la camada

15 Las cerdas se pesaron después del parto y cuando comenzó el destete de los lechones (transcurridos 28 días). Las cerdas del grupo control mantuvieron el peso (232kg) desde el parto hasta que comenzó el destete de los lechones y empezaron a comer pienso lacto-iniciador.

El grupo 1, el de la prueba, redujo ligeramente su peso, de una media de 236kg en el momento del parto a 233kg cuando comenzó el periodo del destete.

20 Los valores del peso de las hembras, corresponden a la media del peso de cada grupo.

25 Además, el crecimiento de la camada fue de la siguiente manera. Para los lechones amamantados con cerdas del grupo 0 y del grupo 1, el aumento de peso fue de 63.40kg y 63.50kg respectivamente. Los valores del peso de los lechones se refieren al total de la camada.

30 Los parámetros productivos indirectos evaluados fueron: a) consumo de pienso lacto-iniciador, y b) secreción de leche de las cerdas.

El consumo de pienso lacto-iniciador en las cerdas del grupo 0 fue de 210 g/día, mientras que los lechones de hembras del grupo 1 consumen sólo 85g/día.

35 Todos estos datos analizados indican que los lechones alimentados con leche materna de las hembras del grupo 1 consumen menos pienso lacto-iniciador, porque la leche materna de las cerdas del grupo 1 es de mejor calidad y les gusta más a sus lechones

que a los del grupo 0. Indirectamente, se ha demostrado que la producción de leche del grupo 1 fue mayor que la producción de leche del grupo 0, ya que los lechones crecieron de forma igual.

5 El parámetro de producción de leche se midió indirectamente mediante el cálculo de la ganancia de peso de la camada respecto al pienso lacto-iniciador consumido.

En otras palabras, los lechones del grupo 1 comieron un 60% menos de pienso lacto-iniciador que los lechones del grupo 0.

10 Los lechones que se alimentan con mayor cantidad de leche materna consumen menos pienso lacto-iniciador. Los piensos lacto-iniciadores son aquellos piensos que se suministran a los lechones en sustitución de la leche materna. Estos piensos lacto-iniciadores son de elevado coste y suponen una carga para los ganaderos.

15 Es interesante, en términos de eficiencia y rentabilidad de las granjas, poder iniciar la administración de pienso lacto-iniciador en una etapa posterior. Esto se consigue facilitando a las cerdas “madres” un pienso (composición comestible) suplementado con Stevia Rebaudiana como mezcla de sólidos secos (hojas:tallos 30:70) con una  
20 relación comprendida entre 25:75 y 35:65 % w/w que proporcionará de 150ppm a 3000ppm de glicósidos de esteviol contenidos en peso final de pienso.

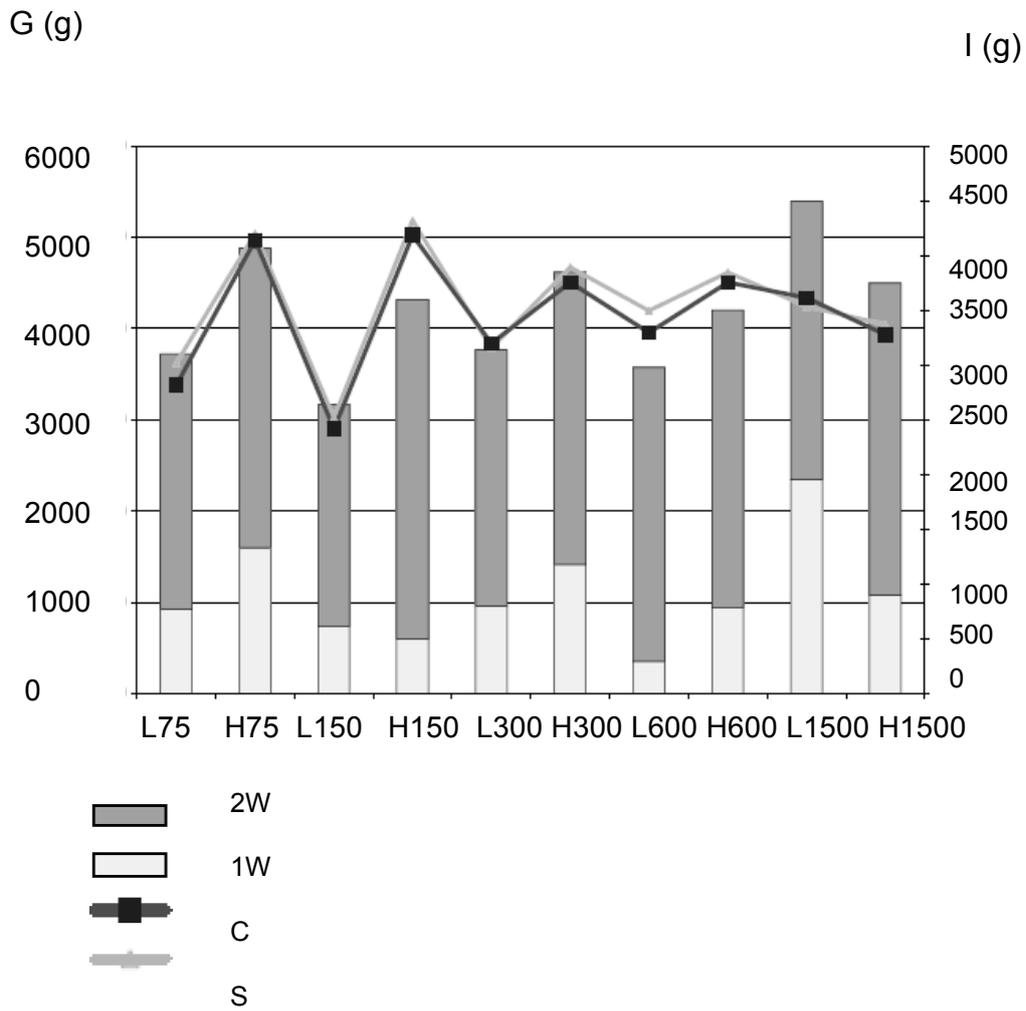
REFERENCIAS CITADAS

- US3539686
- RU2376863C2
- 5 - EP 1106076
- Voisley and Hunt et al., "Effect of Compression Speed on the Behaviour of Eggshells", J. agric. Engng Res.-1969, vol. 14(1), pp. 40-46.
- Ketelaerea et al., " Measuring the eggshell strength of 6 different genetic strains of laying hens: techniques and comparisons.", Br Poult Sci. - 2002, Vol. 43(2), pp. 238-44.

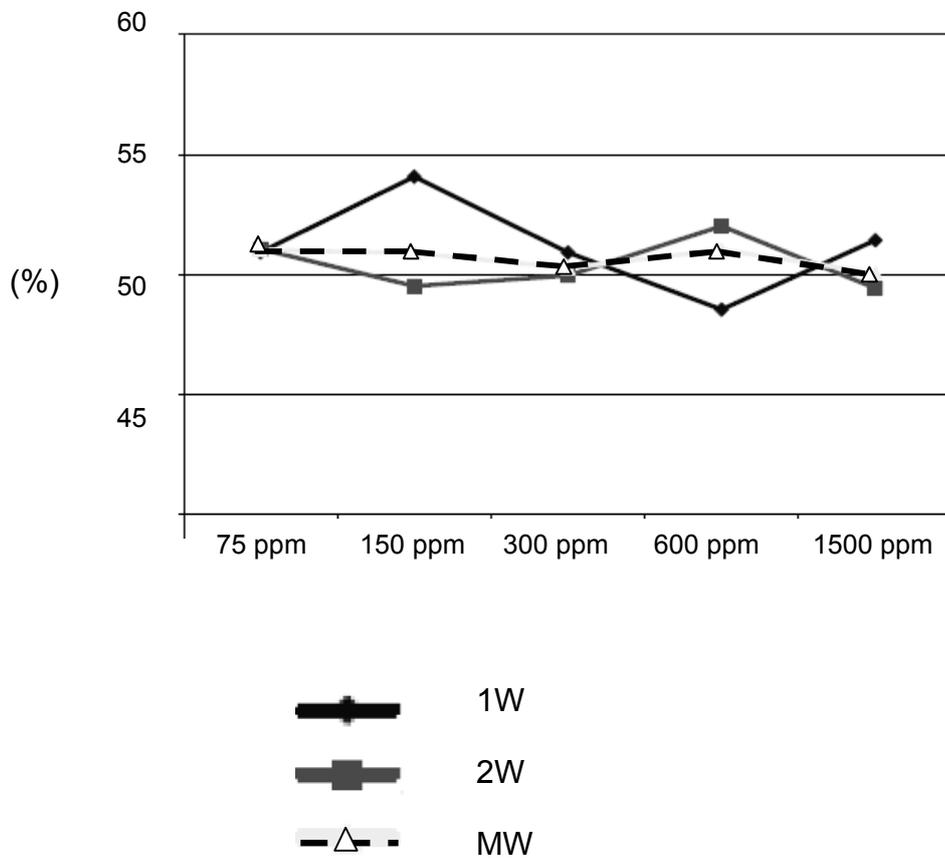
REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición comestible que contiene una cantidad de glicósidos de esteviol comprendida entre 150 ppm y 3000 ppm, cuya composición comprende una mezcla de sólidos secos que es una mezcla de hojas y tallos de la planta Stevia Rebaudiana, las hojas y los tallos estando en una proporción comprendida entre 25:75 y 35:65 w/w%, donde la mezcla de sólidos secos en relación con el peso total de la composición comestible está comprendida entre 0.025% y 0.5% en peso de la composición comestible final.
- 10 2. La composición comestible según la reivindicación 1, donde la relación entre las hojas y los tallos es 30:70 w/w %.
- 15 3. La composición comestible según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde los glicósidos de esteviol se encuentran en una concentración final comprendida entre 150 ppm y 1500 ppm.
- 20 4. La composición comestible según la reivindicación 3, donde los glicósidos de esteviol se encuentran en una concentración final de 300 ppm.
5. La composición comestible según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que es un pienso.
- 25 6. La composición comestible según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la planta Stevia Rebaudiana es de Paraguay.
7. Un procedimiento para la preparación de una composición comestible como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende:
- 30 a) secar la planta Stevia Rebaudiana a una temperatura comprendida entre 18 °C-35 °C,
- b) separar los tallos de las hojas para obtener una fracción de tallo seco y una fracción de hojas secas, y
- c) mezclar las fracciones de hojas y tallo de la planta Stevia Rebaudiana en una
- 35 proporción comprendida entre 25:75 y 35:65 % w/w, para obtener una mezcla de sólidos secos.

8. El procedimiento de la reivindicación 7, que además comprende la molturación de las hojas y los tallos de la etapa c) para obtener un polvo.
- 5 9. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, donde la mezcla de sólidos secos de la etapa c) se añade a otros componentes de la composición comestible en una cantidad tal que la composición comestible tiene una cantidad final de glicósidos de esteviol comprendida entre 150 ppm y 3000 ppm.
- 10 10. Uso de una composición comestible como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-6, como aditivo en piensos o como suplemento nutricional.
11. Uso de la composición comestible como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-6, como agente colorante de la yema de huevo.
- 15 12. Uso de la composición comestible como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-6, como agente endurecedor de la cáscara de huevo.
13. Uso de la composición comestible como se define en cualquiera de la
- 20 13. Uso de la composición comestible como se define en cualquiera de la reivindicaciones 1-6, como potenciador de la productividad animal.
14. Uso de la composición comestible según la reivindicación 13, en el que el aumento de la productividad animal consiste en aumentar la producción de carne.
- 25 15. Uso de la composición comestible según la reivindicación 13, en el que el aumento de la productividad animal consiste en aumentar la producción lechera.
16. Composición comestible como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para su uso en la prevención y/o el tratamiento del desequilibrio de la microbiota en el
- 30 16. Composición comestible como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para su uso en la prevención y/o el tratamiento del desequilibrio de la microbiota en el tracto gastrointestinal de los animales.



**FIG. 1**



**FIG. 2**