

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 610**

51 Int. Cl.:

A61K 9/50 (2006.01)

A61K 36/899 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61P 1/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.08.2013 PCT/BR2013/000324**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.02.2014 WO14028999**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2013 E 13830914 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2905018**

54 Título: **Micropartículas de aceite esencial y usos de las mismas para prevenir enfermedades entéricas**

30 Prioridad:

29.08.2012 BR 102012021975

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

06.03.2018

73 Titular/es:

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP (50.0%)

Rua Roxo Moreira 1831 Cidade Universitária "Zeferino Vaz" Distrito de Barão Geraldo Caixa Postal 6131

13083-970 Campinas - SP, BR y OURO FINO SAÚDE ANIMAL LTDA. (50.0%)

72 Inventor/es:

DUARTE, MARIA CRISTINA TEIXEIRA;

FIGUEIRA, GLYNN MARA;

FOGLIO, MARY ANN;

RODRIGUES, RODNEY ALEXANDRE;

CORAUCCI NETO, DOLIVAR;

RUIZ, ANA LÚCIA TASCÁ GOIZ y

CARVALHO, JOÃO ERNESTO DE

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 657 610 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

Micropartículas de aceite esencial y usos de las mismas para prevenir enfermedades entéricas

5 **Campo de la invención**

La presente invención es una micropartícula que contiene aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* y *Cymbopogon martinii* para el control de enfermedades entéricas provocadas por microorganismos. Más específicamente, la micropartícula de la presente invención puede usarse en el control de infecciones entéricas provocadas por bacterias patógenas en seres humanos y animales, que puede usarse como alternativa a antibióticos para este fin. La micropartícula puede emplearse en la industria veterinaria y farmacéutica y puede administrarse por vía oral.

15 **Antecedentes de la invención**

Actualmente, las infecciones del tracto digestivo están provocadas por microorganismos patógenos y oportunistas. Como ejemplo, se mencionan las cepas toxigénicas de *Escherichia coli* (ETEC) que producen enterotoxinas que provocan diarrea y deshidratación tanto en seres humanos, conocida como diarrea del viajero, como en animales, denominada colibacilosis.

En seres humanos, ETEC es la causa más común de diarrea del viajero, que afecta a millones de visitantes en zonas de riesgo tropicales y subtropicales cada año. Estos patógenos pueden adquirirse ingiriendo alimentos y agua contaminados. En el sector veterinario, la producción de cerdo es una cadena satisfactoria en la industria ganadera de Brasil. La colibacilosis entérica es la enfermedad con el mayor impacto sobre la industria de ganadería porcina, pero no se limita a la misma. Por tanto, todavía es común usar aditivos químicos en el pienso como promotores del crecimiento. Sin embargo, los productos terapéuticos y profilácticos pueden dejar residuos en productos comestibles, contaminar el ecosistema y desarrollar cepas microbianas resistentes.

Dados estos problemas, algunas agencias gubernamentales en varios países han estado limitando el uso de agentes antimicrobianos, además de prohibirlos como promotores del crecimiento en animales, lo que demanda la búsqueda de alternativas al uso de estas sustancias.

Entre las alternativas viables para la sustitución de agentes antimicrobianos como promotores del crecimiento se encuentran el desarrollo y la aplicación de vacunas, el control de condiciones del entorno para la creación y el uso de pienso (dieta) con el uso apropiado de agentes prebióticos, probióticos, simbióticos, enzimas y compuestos de vegetales.

El trabajo de Hur y Lee (2012) compara los efectos de un candidato de vacuna contra ETEC con el obtenido por una vacuna comercial, revelando que el candidato desarrollado por el grupo de investigación es prometedor en la lucha contra la colibacilosis. Sin embargo, la preparación de la vacuna implica el estudio de genes que provocan virulencia de ETEC, la inserción de estos genes en un plásmido y la transfección de plásmidos en un microorganismo atenuado y después la inmunización de animales. La micropartícula propuesta en la presente invención prescinde del uso de técnicas de ingeniería genética que, además de encarecer el producto, también presentan aspectos de eficacia, seguridad y éticos y sociales como barreras a la comercialización.

Se han propuesto aditivos a alimentos para sustituir a antibióticos y se ha mostrado que son eficaces en combatir ETEC. El trabajo de Wu *et al.* (2012) muestra que el péptido cecropina AD añadido a la dieta basal en una proporción de 400 mg/kg tiene eficacia en el aumento de la inmunidad y retención de nitrógeno y energía, así como la reducción de patógenos intestinal en cochinitos destetados. Sin embargo, la cecropina AD usada en este trabajo se obtuvo mediante aislamiento de *Hyalophora cecropia* y su expresión en microorganismo genéticamente modificado *Bacillus subtilis*, un procedimiento que requiere la purificación de la sustancia usada y cuyos resultados prácticos de aplicar el control de diarrea en cerdos se encontró que estaba entre el del grupo de control y el grupo tratado con agentes antimicrobianos (kitasamicina 100 mg/kg y sulfato de colistina 800 mg/kg). La micropartícula propuesta en la presente invención mostró tener una actividad similar a antibióticos y ser superior al control usado.

El documento CN 102178115 con fecha del 13/05/11, se refiere a una composición que comprende diferentes productos derivados de maíz, soja, calcio y pescado para su adición a alimentos (premezcla) de cochinitos destetados. La supuesta ventaja de la composición final (premezcla reforzada con productos derivados de maíz, soja, calcio y pescado) es resolver problemas de insuficiencia inmunitaria, secreción de enzimas digestivas, bajo desarrollo del tubo digestivo y diarrea frecuente en estos animales. Sin embargo, ninguna parte de la composición contiene vitaminas, minerales y enzimas que actúen directamente sobre ETEC u otros microorganismos patógenos.

En seres humanos, el trabajo de Hayat *et al.* (2011) muestra que la práctica actual en el control de la diarrea del viajero está presente en la educación, rehidratación agresiva, terapia antidiarreica y el uso de agentes antimicrobianos. Sin embargo, existe una preocupación sobre el uso irracional de agentes antimicrobianos debido a la inducción de resistencia bacteriana. Alternativamente, existen evidencias de que una forma de control de

infecciones del tubo digestivo, según Licht *et al.* (2012), es el uso de agentes probióticos que puedan estimular selectivamente el crecimiento de bacterias beneficiosas intestinales en el colon. Sin embargo, la ausencia de publicaciones con resultados negativos puede representar un sesgo en la confirmación del uso de agentes prebióticos como método de control o prevención de estas infecciones.

5 La patente US 20030157159, con fecha del 21/08/03, describe una composición que contiene terpenos y un tensoactivo en la razón del 1 al 99%, que son útiles para la prevención o el tratamiento de infecciones del tubo digestivo en animales y seres humanos. También propone la inclusión de los terpenos mencionados en liposomas. Sin embargo, la actividad antimicrobiana *in vitro* frente a diversos patógenos notificada en este documento se
10 demuestra mediante la mezcla de terpenos no incluidos en liposomas, que sirven para estabilizar la mezcla frente al uso real. Las micropartículas de la presente invención se obtienen mediante microencapsulación de aceites de *Cymbopogon citratus* y *Cymbopogon martinii* con paredes solubles, lo que proporciona una mejor solubilidad de producto en agua debido al hecho de que se basan en un procedimiento para obtener una emulsión y contienen un tensoactivo como agente auxiliar. Dado que originalmente es un aceite, esto es una ventaja en cuanto a la
15 absorción en el animal, dado que el uso es por vía oral.

El trabajo de Li *et al.* (2012), así como el documento WO 2008/155536, con fecha del 18/06/07, se refiere a un suplemente para alimentar a cochinitos con aceites esenciales microencapsulados, que contiene principalmente cinamaldehído, que puede aumentar la ingesta de alimentos, la tasa de crecimiento y la incidencia de diarrea en
20 animales, pero es un compuesto relativamente tóxico y alergénico (Junior *et al.*, 2005). Sin embargo, la presente invención propone una micropartícula que contiene aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* y *Cymbopogon martinii* microencapsulados, cuya actividad antimicrobiana, en combinación, es mayor que la actividad de los dos aceites aislados. Tal micropartícula presenta un uso seguro y demuestra un efecto antimicrobiano *in vitro* y un rendimiento satisfactorio cuando se usa en el pienso de cerdos en la fase de criadero, con posible uso en la
25 sustitución de antibióticos usados como promotores del crecimiento en animales y como micropartícula profiláctica para infecciones gastrointestinales en seres humanos.

En vista de la técnica anterior, la presente invención tiene ventajas en varios aspectos. En primer lugar, la técnica de microencapsulación mediante secadora por pulverización es una técnica industrial bien establecida fácilmente
30 implementada desde la escala de laboratorio hasta la escala industrial. La microencapsulación proporciona un producto estable frente a agentes externos tales como oxígeno y luz, especialmente durante el almacenamiento del producto.

La presente invención puede aplicarse en los campos farmacéutico y veterinario para la prevención de infecciones gastrointestinales provocadas por enterobacterias tales como *Escherichia coli* ETEC, especialmente como promotor
35 del crecimiento en el pienso en cerdos.

Breve descripción de la invención

40 La presente invención se refiere a una micropartícula que comprende aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* y *Cymbopogon martinii*, un material de pared para la formación de micropartículas, un agente emulsionante y la inclusión o no de las micropartículas en vehículos aceptables farmacéuticos y/o veterinarios, en alimentos, agua o cualquier otro que se administran por vía oral.

45 La micropartícula de la invención puede aplicarse en prevención de infecciones gastrointestinales provocadas por bacterias patógenas en seres humanos y animales. Actualmente, todavía es común usar aditivos químicos en el pienso y el uso de agentes antimicrobianos, que han prohibido algunas agencias gubernamentales por dejar residuos en productos comestibles, contaminar el ecosistema y desarrollar cepas microbianas resistentes. La presente invención puede usarse como alternativa a esta cuestión.
50

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra el crecimiento celular (%) de células tumorales humanas en presencia de la presente invención en un ensayo de toxicidad *in vitro*.
55

La figura 2 muestra el efecto de la administración oral de una única dosis en ratones Wistar/Uni sobre la evolución del peso corporal durante los 14 días tras una única administración de micropartículas de *C. citratus* y *C. martinii* 3:1 (presente invención). Este resultado es parte de un ensayo de toxicidad *in vivo*.

60 La figura 3 muestra la evolución del peso corporal de animal en ratones Wistar/Uni sin tratamiento (grupo "satélite") durante el periodo de 14 días. Este resultado es parte de un ensayo de toxicidad *in vivo*.

Descripción detallada de la invención

65 La presente invención se refiere a una micropartícula que comprende los siguientes componentes:

- aceite esencial de *Cymbopogon citratus*,

- aceite esencial de *Cymbopogon martinii*,

5 - material de pared de micropartículas, y

- agente emulsionante.

10 La micropartícula puede contener las razones de 1:3, 1:1 ó 3:1 de aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* y *Cymbopogon martinii*, preferiblemente 3:1.

Los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* y *Cymbopogon martinii* pueden obtenerse mediante hidrodestilación, mediante destilación al vapor u otros procedimientos que permiten obtenerlos.

15 El material de pared puede seleccionarse del grupo de goma arábiga, maltodextrina, quitosano, goma de anacardo, entre otros o una mezcla de los mismos, preferiblemente maltodextrina.

El recubrimiento de micropartícula puede obtenerse mediante cualquier método conocido en la técnica, que permite la microencapsulación de aceites, por ejemplo, por Rodrigues (2004).

20 El emulsionante puede seleccionarse del grupo de Tween 80, 60 ó 20, lecitina de soja, entre otros, que es preferiblemente Tween 80.

La micropartícula tiene un tamaño variable de entre 100 y 1000 μm y forma esférica.

25 El objetivo de esta solicitud es prevenir infecciones del tracto gastrointestinal provocadas por bacterias patógenas en seres humanos y animales.

30 Las micropartículas pueden administrarse en su forma original o en vehículos aceptables desde el punto de vista farmacéutico y/o veterinario en forma de comprimidos, emulsión, suspensión, cápsula de gel, entre otros.

Adicionalmente, las micropartículas de la presente invención pueden mezclarse con agua, alimentos, pienso o cualquier otro para su administración oral.

35 Preparación de micropartículas de aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* y *Cymbopogon martinii*.

Para la preparación de micropartículas se llevó a cabo un procedimiento conocido en la técnica. Se disolvió el material de pared en agua destilada con una placa con agitación. Se añadieron los aceites y un agente emulsionante a la preparación y se homogeneizó. Tras la homogenización, se hizo pasar la formulación a través de la minisecadora por pulverización. Las condiciones de funcionamiento para la microencapsulación se optimizaron variando la temperatura de entrada de $180^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, la razón de aceite (el 20% en comparación con maltodextrina) y un total de sólidos del 30%. El gas portador usado fue N_2 .

45 Ejemplos

Ejemplo 1: Actividad antimicrobiana de aceite esencial de *Cymbopogon spp* para *E. coli* en diferentes estaciones.

Se evaluó la actividad antimicrobiana de aceites de *Cymbopogon citratus* y *Cymbopogon martinii* para diferentes aislados de *E. coli* así como para la cepa convencional mediante ensayo de microdilución en caldo, según la norma M7-A6 (CLSI, 2003). En una microplaca estéril de 96 pocillos se depositaron 100 μl de caldo Luria (*E. coli*), mientras que la columna 12 se usó para el control de microorganismo y esterilidad del medio de cultivo. En el carril 1 – línea A se añadieron 50 μl de disolución de aceite esencial de concentración conocida y se añadieron además 50 μl de medio, estos relacionados con el control de la esterilidad de muestras.

55 Después, se añadieron 100 μl de los mismos materiales en la línea B, el contenido de los pocillos homogeneizados con medio y se transfirió a los pocillos de la siguiente línea (C), repitiendo este procedimiento hasta la línea H, para obtener una concentración decreciente del material. Se descartaron 100 ml de residuo. Después, se añadieron 100 μl de inóculo de microorganismo, cuya turbidez se comparó con 0,5 en la escala de McFarland y se diluyó hasta una concentración final de 10^4 células/ml. Se sellaron las placas con parafilm® y se incubaron durante 24 horas a 36°C .

60 Tras el periodo de incubación, se añadieron 50 μl de una disolución de cloruro de trifeniltetrazolio, TTC (0,5%) y volvieron a incubarse las placas durante 3 h. Se definió la MIC como la menor concentración de muestra que podía prevenir la aparición del color rojo, administrada al medio cuando las células tenían actividad respiratoria, es decir, cuando había crecimiento del microorganismo.

65 También se incluyó en el ensayo el control de antibiótico de sulfato de gentamicina, así como un control para

confirmar la esterilidad del medio de cultivo y el crecimiento de microorganismos.

También se evaluó la actividad de aceites de *C. citratus* y *C. martinii* a partir de la mezcla de los mismos (la presente invención) en diferentes razones, es decir, 75:25, 25:75 y 50:50 (p/p). En la tabla 1 se muestran los resultados de MIC (concentración inhibitoria mínima, mg/ml).

Tabla 1: Actividad antimicrobiana (MIC, mg/ml) del aceite esencial de especies aromáticas para *E. coli*, dependiendo de la estación. Los aceites se sometieron a prueba de manera individual y en diferentes proporciones.

Estación (2009)	Cepa de <i>E. coli</i>	MIC (mg/ml)				
		Cc	Cm	Cc+Cm (75:25)	Cc+Cm (25:75)	Cc+Cm (50:50)
Verano	ATCC11775	0,8	1,0	0,5	0,5	0,7
	MB-0016	1,4	1,6	0,9	0,9	1,0
	MB-0020	1,0	1,0	0,8	0,8	0,8
	MB-0021	1,8	1,0	1,0	1,0	1,0
	MB-0022	1,5	1,7	1,0	1,0	1,0
	MB-0024	1,2	1,5	1,0	1,0	1,0
	MB-0025	1,1	1,0	0,8	1,0	0,9
Otoño	ATCC11775	0,5	0,5	0,5	0,4	0,5
	MB-0016	0,4	0,46	0,25	0,1	0,4
	MB-0020	0,8	0,93	0,8	0,9	1,46
	MB-0021	1,1	1,2	1,0	0,9	1,46
	MB-0022	1,1	0,9	1,0	1,0	1,0
	MB-0024	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	MB-0025	1,0	0,9	0,7	0,7	0,8
Invierno	ATCC11775	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	MB-0016	1,0	0,5	1,0	0,5	1,0
	MB-0020	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	MB-0021	*	1,0	*	1,0	1,0
	MB-0022	1,6	1,0	1,0	1,0	1,0
	MB-0024	*	0,9	1,6	0,9	1,0
	MB-0025	*	*	1,7	1,0	1,2
Primavera	ATCC11775	1,0	0,25	0,35	0,5	0,5
	MB-0016	0,12	0,5	0,5	0,5	0,25
	MB-0020	1,1	0,6	0,9	0,8	1,0
	MB-0021	*	1,0	1,0	1,0	1,0
	MB-0022	*	1,1	1,3	1,0	1,0
	MB-0024	1,4	1,0	1,2	1,0	1,0
	MB-0025	1,3	1,0	1,1	1,0	1,0

*MIC > 2,0 mg/ml; Cc = *Cymbopogon citratus*, Cm = *C. martinii*

10

Los resultados en la tabla 1 muestran que, en general, todas las combinaciones de aceite proporcionaron mejores actividades que cuando se sometieron a prueba por separado.

15

Según los resultados, puede mencionarse que la especie *C. martinii* (palmarosa) demostró ser la más activa frente a diferentes cepas de *E. coli* aisladas a partir de cerdos con diarrea, con un amplio espectro de acción, con las mejores actividades entre el otoño y el invierno. Sin embargo, la mezcla de los aceites de *C. citratus* y *C. martinii* en la razón de 25:75 (1:3) o 75:25 (3:1) proporcionó actividades incluso mejores.

Ejemplo 2: Citotoxicidad *in vitro* de los aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* y *Cymbopogon martinii* de la presente invención.

5 Se evaluó la citotoxicidad *in vitro* de aceites esenciales (presente invención) frente a dos líneas celulares normales (VERO, células epiteliales de riñón de mono verde africano, y HaCat, queratinocitos humanos inmortales) y frente a un panel de células tumorales humanas.

10 Basándose en los resultados, se generaron gráficos de tasa de crecimiento a partir de la concentración de muestra para cada una de las cepas sometidas a prueba. Pudieron calcularse tres concentraciones eficaces denominadas GI₅₀ (inhibición del crecimiento, la concentración requerida para alterar el 50% del crecimiento celular), TGI (inhibición del crecimiento total, la concentración requerida para el 0% de crecimiento celular) y LC₅₀ (concentración letal, concentración requerida para el 50% de muerte celular) mediante regresión no lineal, sigmoidea, usando el software 8.0 Origin.

15 Los resultados de prueba obtenidos se muestran en la figura 1 (presente invención) y en la tabla 2. En este modelo, una manera de interferir con la tasa de crecimiento es mediante lectura espectrofotométrica de la absorbancia de proteínas celulares teñidas con sulforodamina B (SRB), un colorante aniónico que tiñe de color rosa brillante. Este colorante puede unirse a terminaciones de proteínas de aminoácidos básicos en células vivas fijadas con ácido tricloroacético (TCA), siendo por tanto un ensayo independiente del metabolismo celular y permitiendo una medición sensible de la linealidad de proteínas con el número de células en cultivo. El ensayo de SRB es considerablemente rápido, sencillo y con sensibilidad de muestra comparable a los ensayos de fluorescencia y mejor que los ensayos que usan colorantes visibles, incluso a bajas concentraciones de células (de 1000 a 2500 células por cámara) (Skehan *et al*, 1990).

25 Tabla 2: Valores de concentración eficaz TGI (µg/ml, inhibición del crecimiento total, concentración necesaria para que no se produzca crecimiento celular) de la presente invención y de doxorubicina.

	2	m	a	7	4	Promedio de TGI*	V	q
Doxorubicina	1,24	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	NT	> 25
Micropartículas de <i>C. martinii</i> y <i>C. citratus</i>	43,1	72,9	127,3	127,3	217,9	117,7	84,2	> 250

30 Líneas celulares humanas: 2 = U251 (glioma, SNC); m = MCF-7 (mama); a = NCI-ADR/RES (ovario, con fenotipo resistente a múltiples fármacos); 7 = 786-0 (riñón); 4 = NCI-H460 (pulmón, células no pequeñas), V = VERO (células epiteliales de riñón de mono verde africano); q = HaCat (queratinocito, célula normal inmortalizada). NT = No sometido a prueba.

35 TGI: Inhibición del crecimiento total, concentración requerida para que se produzca una inhibición total del crecimiento celular; *Media de TGI: media aritmética de los valores de TGI para líneas tumorales. Parámetros para la evaluación de la actividad sobre líneas celulares tumorales: inactivo (media de TGI > 50 µg/ml), actividad débil (15 µg/ml < media de TGI < 50 µg/ml), actividad moderada (6,25 µg/ml < media de TGI < 15 µg/ml) y actividad potente (media de TGI < 6,25 µg/ml) (Fouche *et al*. 2008)

40 Esta prueba permite evaluar la actividad antitumoral mediante exposición de células tumorales humanas en fase de crecimiento exponencial a diferentes concentraciones de la muestra y si la exposición condujo a una interrupción en la tasa de crecimiento sin muerte celular (actividad citotóxica) o provocó la muerte celular (actividad citocida). Para medir la actividad, se calculó una concentración eficaz denominada TGI (inhibición del crecimiento total, concentración requerida para que se produzca el 0% de crecimiento celular) (Shoemaker, 2006).

45 Se usó doxorubicina para quimioterapia como control positivo. Además de un patrón de comparación, el propósito principal de usar este control fue verificar que todas las líneas celulares empleadas mantenían el perfil de respuesta a la quimioterapia. Esto se debe a que con pases sucesivos necesarios para el mantenimiento del cultivo celular, existe la posibilidad de cambiar el linaje en cultivo, y esta mutación puede detectarse mediante el cambio en la respuesta frente a doxorubicina. Además, con el fin de minimizar la aparición de mutaciones, las líneas celulares sólo se perpetúan hasta 20 pases, tras lo cual se sustituyen por nuevas células de la misma cepa que se mantuvieron congeladas.

50 Con respecto a las cepas normales, la presente invención mostró actividad antiproliferativa de débil a moderada sobre la línea VERO (TGI de 84,2 µg/ml) para *C. martinii* y *C. citratus* (tabla 2), lo que sugiere una pequeña acción citotóxica sobre células renales. Sin embargo, el análisis de las pruebas *in vivo* mostró que el efecto *in vitro* no se tradujo en toxicidad en animales evaluados. Por lo demás, la presente invención no interfirió con el crecimiento de la línea celular de queratinocitos humanos (HaCaT), con valores de TGI > 250 µg/ml a la máxima concentración sometida a prueba (tabla 2).

55 En cuanto a la acción sobre líneas celulares tumorales humanas, la presente invención dio un resultado de prueba de inactivo, dado que la TGI estaba por encima del límite establecido para la actividad (50 µg/ml).

Ejemplo 3: Prueba de toxicidad tras una única dosis en roedores (OECD, 2001).

Se administró el objeto de la presente invención, la micropartícula de aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* y *Cymbopogon martinii* 3:1, en una única dosis de 5000 mg/kg a cinco animales, concretamente: mascota 2.1 (prueba preliminar) y animales 2.2 a 2.5 (prueba principal). Cinco animales adicionales (identificados como 3.1 a 3.5) no recibieron ningún tratamiento oral, considerándose como segundo grupo de control (“satélite”) de experimentación.

Veinticuatro horas tras la administración de la dosis oral de la presente invención de 5000 mg/kg, se observó piloerección en todos los animales de experimentación, normalizándose la aparición a las 48 horas tras el inicio de la prueba. En los días siguientes, la evaluación clínica individual de animales de experimentación, incluyendo aspecto (estado general del animal, y cambios en la piel y el pelo), evolución del peso corporal, signos clínicos (frecuencia cardíaca y respiratoria), comportamiento espontáneo (hiperactividad/letargo) y respuesta a estímulos (reflexiones variables) no mostró ningún cambio en el comportamiento y el estado de ánimo, actividad motora, tono muscular, reflejos, actividad del sistema nervioso central y autonómico. A lo largo de todo el periodo de ensayo fue posible detectar el olor característico de los aceites esenciales exhalados por los animales. Al final del ensayo, en el momento del sacrificio, todos los animales estaban sanos. La tabla 3 muestra los valores correspondientes de la evolución del peso corporal por animal durante el periodo de experimentación de los animales tratados con la presente invención y los animales que no recibieron tratamiento (“satélite”).

Tabla 3: Efecto de administración oral de una única dosis en ratas Wistar/Uni sobre la evolución del peso corporal durante los 14 días tras una única administración de las micropartículas de la presente invención así como los animales en el grupo de control (“satélite”) (ANOVA: F (2,12) = 0,17, prueba de Duncan p > 0,05).

Grupo	Animal	Peso inicial (g)	Vol. de adm. (ml)	Peso a los 7 días (g)	Peso final (g)	Aumento de peso total (g)	Muertes
presente invención	2.1	310	3,1	333	346	36	0
	2.2	285	2,85	310	316	31	0
	2.3	305	3,05	327	321	16	0
	2.4	332	3,32	356	366	34	0
	2.5	306	3,06	306	314	12	0
media ± dpm		306.8 ± 16.9		326,4 ± 20,0	332,6 ± 22,6	25,8 ± 11,0	
satélite	3.1	214	-	228	238	24	0
	3.2	232	-	254	267	35	0
	3.3	217	-	229	239	22	0
	3.4	262	-	275	282	20	0
	3.5	253	-	261	273	20	0
media ± dpm		235.6 ± 21.4		249,4 ± 20,5	259,8 ± 20,2	24,2 ± 6,3	

La figura 2 muestra el aumento de peso corporal del animal, teniendo en cuenta la diferencia de los pesos individuales al comienzo y al final de la prueba de toxicidad tras una única dosis. Al comparar con los datos de aumento de peso corporal de ratones Wistar/Uni, machos, mantenidos en las mismas condiciones de entorno y alimentados con el mismo pienso (grupo “satélite”, figura 3), los animales de experimentación mostraron un aumento de peso compatible con la normalidad. El análisis estadístico (prueba de Duncan) en el aumento de peso entre el grupo tratado con la presente invención y el control de “satélite” no reveló ninguna diferencia significativa, lo que sugiere la ausencia de toxicidad de la presente invención. Al final del periodo de experimentación (14 días), se realizaron la autopsia de todos los animales y el análisis histopatológico y no revelaron ninguna evidencia que sugiriera toxicidad. Usando el sistema de clasificación de productos químicos del GHS, se clasificaron las micropartículas de la presente invención como no tóxicas tras una única dosis (LD₅₀ mayor de 5000 mg/kg).

Según los resultados de la prueba de toxicidad oral tras una única dosis en roedores, la presente invención no mostró ningún efecto tóxico sistémico que pudiera mostrarse en ratas Wistar/Uni adultas tras una única administración oral a una dosis de 5000 mg/kg. Siguiendo la clasificación del GHS (“Sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos”) para pruebas de toxicidad tras una única dosis, se clasificaron las micropartículas de la presente invención como no tóxicas tras una única dosis (LD₅₀ mayor de 5000 mg/kg). Los animales de experimentación tratados con la presente invención con una única dosis de 5000 mg/kg no mostraron ningún efecto tóxico sistémico que pudiera mostrarse, con un aumento de peso corporal que concordaba con la misma edad (grupo “satélite”). Se analizó estadísticamente la uniformidad en el aumento de peso entre los grupos de experimentación mediante la prueba de Duncan (p>0,05), que corrobora esta afirmación. Tras el sacrificio,

no se detectó ningún cambio macroscópico que sugiriera toxicidad en órganos vitales.

Ejemplo 4: Evaluación del rendimiento y puntuación de diarrea en fase de criadero en cochinitos alimentados con la presente invención en la realización preferida.

5 Se evaluó la presente invención (razón 3:1) con respecto al rendimiento y la puntuación de diarrea en cochinitos en la fase de criadero (tratamiento CB006-S). Para esta evaluación, 72 cochinitos de ambos sexos con una edad inicial de 28 días y terminal de 63 días. Se alojaron 4 cochinitos en cada corral (dos machos y dos hembras) que formaron una unidad de experimentación. Las variables analizadas fueron: rendimiento de animal, puntuación de diarrea y porcentaje de cochinitos entregados. Los periodos del estudio fueron: I, desde 28 hasta 35; II, desde 28 hasta 49; y III desde 28 hasta 63 días de edad. Los tratamientos fueron: 1) control negativo, dieta basal, 2) antibióticos, dieta basal más promotor del crecimiento MSD 08 63 g/tonelada de pienso (5 ppm), 3) Prueba, dieta basal más CB006-S 2.000 g/tonelada de pienso.

15 En la tabla 4 se muestran los resultados de rendimiento de los cochinitos durante el primer periodo (de 8 a 35 días) para diferentes grupos.

Tabla 4: Promedios de peso inicial, peso final, aumento diario promedio (GMDP), ingesta de pienso diaria promedio (CMDR) y conversión de pienso (CA) de cochinitos para el periodo 1, desde 28 hasta 35 días de edad.

Grupo	Peso inicial	Peso final	GMDP de 28 a 35	CMDR de 28 a 35	CA de 28 a 35
1	7,55a	9,01a	0,183a	0,299a	1,81a
2	7,56a	9,39a	0,228a	0,318a	1,44a
3	7,48a	8,86a	0,172a	0,303a	2,23a
% de CV	2,64	6,21	36,31	10,91	49,93

20 Los promedios seguidos por la misma letra en las columnas no difieren según la prueba de Tukey (P > 0,05).

Los resultados de rendimiento de los cochinitos durante el periodo 1 no mostraron ninguna diferencia significativa entre grupos.

25 En la tabla 5 se muestran los resultados de rendimiento de los cochinitos durante el periodo 2 (de 28 a 49 días), para diferentes grupos.

Tabla 5: Promedios de peso inicial, peso final, aumento diario promedio (GMDP), ingesta de pienso diaria promedio (CMDR) y conversión de pienso (CA) de cochinitos para el periodo 2 de 28 a 49 días de edad.

Grupo	Peso inicial	Peso final	GMDP de 28 a 49	CMDR de 28 a 49	CA de 28 a 49
1	7,56	13,31b	0,274b	0,371b	1,94a
2	7,54	15,12a	0,360a	0,539a	1,51a
3	7,48	14,16ab	0,318ab	0,537a	1,74a
% de CV	2,64	9,47	19,64	14,81	6,28

30 Los promedios seguidos por la misma letra en las columnas no difieren según la prueba de Tukey (P > 0,05).

35 Los resultados de rendimiento para GMDP y peso final mostraron una diferencia significativa (P > 0,05) a favor del grupo 2, aunque el grupo 3 no era estadísticamente diferente de los grupos 1 y 2; sin embargo, la CMDR era significativamente menor para el grupo 1 en comparación con los otros grupos, y entre los grupos 2 y 3 no había ninguna diferencia significativa. No hubo ninguna diferencia significativa con respecto a la conversión de pienso entre los grupos sometidos a prueba.

40 En la tabla 6 se muestran los resultados de rendimiento de los cochinitos durante el periodo 3 (desde 28 hasta 63 días) para los diferente grupos.

Tabla 6: Promedios de peso inicial, peso final, aumento diario promedio (GMDP), ingesta de pienso diaria promedio (CMDR) y conversión de pienso (CA) de cochinitos para el periodo total de 28-63 días de edad.

Grupo	Peso inicial	Peso final	GMDP de 28 a 63	CMDR de 28 a 63	CA de 28 a 63
1	7,55	20,41b	0,369b	0,672b	1,84a
2	7,56	21,34ab	0,393ab	0,714a	1,82a
3	7,48	22,81a	0,437a	0,722a	1,65a
% de CV	2,64	6,59	9,80	4,44	9,49

Los promedios seguidos por la misma letra en las columnas no difieren según la prueba de Tukey ($P > 0,05$).

Los resultados mostraron que el peso final era mayor en el grupo 3, mientras que el grupo 2 no difirió estadísticamente de los grupos 1 y 3; se observaron los mismos resultados para GMDP. Para CMDR, los grupos 2 y 3 no difirieron estadísticamente entre sí, pero fueron mayores que el grupo 1. Para el parámetro de conversión de pienso no hubo ninguna diferencia entre los grupos en este periodo.

No hubo ninguna diferencia estadística entre los grupos en relación con la incidencia de diarrea y el porcentaje de cochinillos entregados a unidades de crecimiento y sacrificio (tabla 7) no se vio influido ($P < 0,05$) por los tratamientos de experimentación, observándose que en todos los grupos el porcentaje de animales entregados estaba dentro de los valores convencionales deseados (80-85%) para un sistema de ganadería de cerdos adoptado por la industria ganadera.

Tabla 7: Animales totales por grupo, número de animales muertos, número de animales desperdiciados y % de animales entregados al crecimiento y sacrificio, según diferentes grupos de experimentación.

Grupos	Número total de animales a los 63 días	Número total de animales muertos	Número de animales no entregados / desperdiciados	% de animales entregados
1	23	1	3	86,95
2	24	-	3	87,5
3	23	1	2	91,30

En las condiciones de experimentación, el aditivo CB006-S mostró resultados similares al antibiótico MSD08 y fue superior al control en el rendimiento de cochinillos, en el periodo de 28-63 días de edad, mostrando que puede usarse para dietas para cochinillos recién destetados como posible sustituto de antibióticos usados en esta fase. Ningún animal mostró signos de intoxicación tras la ingestión del producto sometido a prueba.

Referencias

Hur, J.; Lee, J.H. Comparative evaluation of a vaccine candidate expressing enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) adhesins for colibacillosis with a commercial vaccine using a pig model. *Vaccine*, vol. 30, págs. 3829-3833, 2012.

Wu, S.; Zhang, F.; Huang, z.; Liu, H.; Xie, C.; Zhang, J.; Thacker, P.A.; Qiao, S. Effects of the antimicrobial peptide cecropin AD on performance and intestinal health in weaned piglets challenged with *Escherichia coli*. *Peptides*, vol. 35, págs. 225-230, 2012.

Hayat, A.M.; Tribble, D.R.; Sanders, J.W.; Faix, D.J.; Shiau, D.; Armstrong, A.W.; Riddle, M.S. Knowledge, attitudes, and practice of travelers' diarrhea management among frontline providers. *Journal of Travel Medicine*, vol. 18 (5), págs. 310-317, 2011.

Licht, T.R.; Ebersbach, T.; Frokiaer, H. Probiotics for prevention of gut infection. *Trends in Food Science & Technology*, vol. 23, págs. 70-82, 2012.

Li, S.Y.; Ru, Y.J.; Liu, M.; Xu, B.; Péron, A.; Shi, X.G. The effect of essential oils on performance, immunity and gut microbial population in weaner pigs. *Livestock Science*, vol. 145, págs. 119-123, 2012.

Junior, V.F.V.; Pinto, A.C.; Maciel, M.A.M. Plantas medicinas, cura segura? *Química Nova*, vol. 28 (3), 519-528, 2005.

Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J.T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 82 (13), págs. 1107-1118, 1990.

Fouche, G.; Cragg, G.M.; Pillay, P.; Kolesnikova, N.; Maharaj, V.J.; Senabe, J. In vitro anticancer screening of South African plants. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 119, págs. 455-461, 2008.

Shoemaker, R.H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat Ver Cancer*, vol. 6, pág. 813-823, 2006.

OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS - Acute Oral Toxicity: 420 - adopted 17/12/2001. "Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Substâncias Químicas" (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals- GHS) - <http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/officialtext.html>.

- Rodrigues, RAF Preparo, caracterização e avaliação funcional de microcápsulas obtidas por spray drying, contendo extrato de café crioconcentrado. Fac Eng Alimentos UNICAMP, 2004.

REIVINDICACIONES

1. Micropartícula que comprende los siguientes componentes:
- 5 - aceite esencial de *Cymbopogon citratus*;
- aceite esencial de *Cymbopogon martinii*;
- material de pared de micropartículas, y
10 - agente emulsionante.
2. Micropartícula, según la reivindicación 1, que puede comprender aceites esenciales de *Cymbopogon citratus* y *Cymbopogon martinii* en las razones de 1:3, 1:1 ó 3:1, preferiblemente 3:1.
- 15 3. Micropartícula, según la reivindicación 1, en la que el material de pared puede seleccionarse del grupo de goma arábica, maltodextrina, quitosano, goma de anacardo, entre otros o una mezcla de los mismos, preferiblemente maltodextrina.
- 20 4. Micropartícula, según la reivindicación 1, en la que el agente emulsionante puede seleccionarse del grupo de Tween 80, 60 ó 20, lecitina de soja, entre otros, preferiblemente Tween 80.
5. Micropartícula, según la reivindicación 1, que tiene un tamaño variable de entre 100 y 1000 μm y forma esférica.
- 25 6. Micropartícula, según la reivindicación 1, que se administra en su forma original o en vehículos con vehículos aceptables farmacéuticos y/o veterinarios, en forma de comprimidos, emulsión, suspensión, cápsula de gel, entre otros.
- 30 7. Micropartícula, según la reivindicación 1, que se mezcla con agua, alimentos, pienso o cualquier otro para administración oral.
8. Micropartícula según las reivindicaciones 1 a 7, para su uso en la prevención de infección del tracto gastrointestinal en seres humanos y animales.

FIG. 1

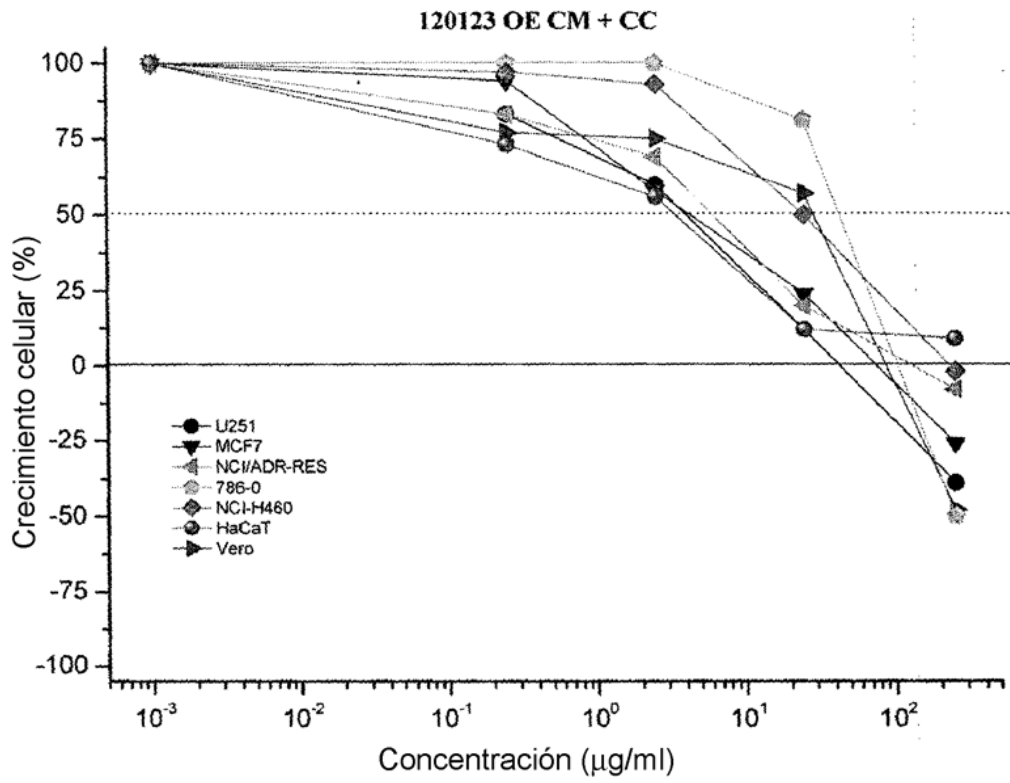


FIG. 2

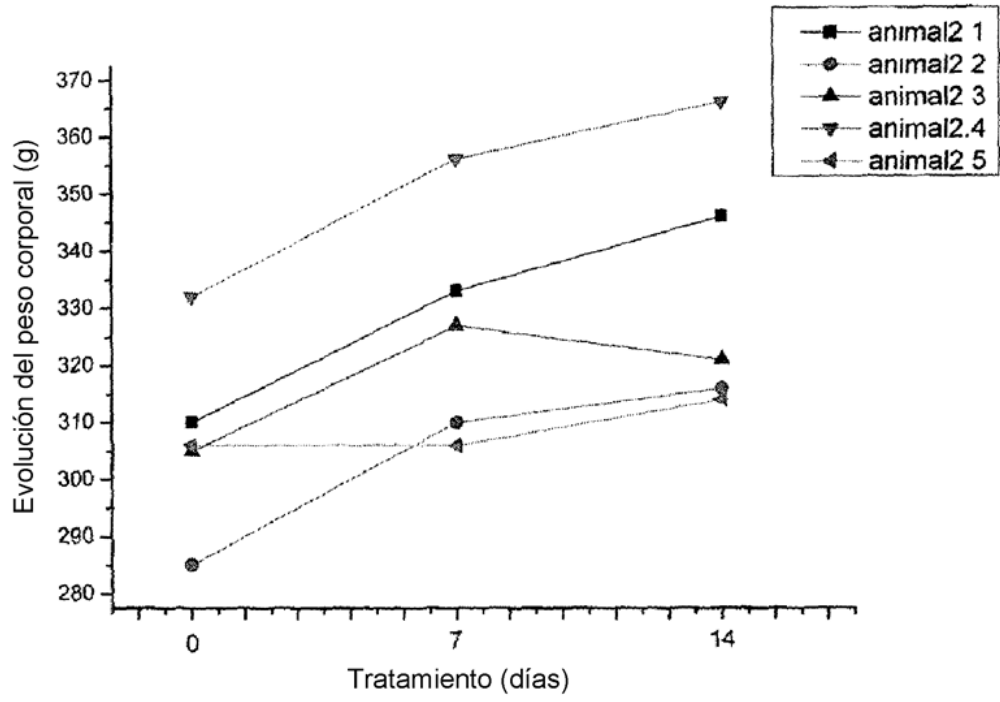


FIG. 3

