

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 730 385**

21 Número de solicitud: 201830456

51 Int. Cl.:

**A23K 10/30** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

**09.05.2018**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**11.11.2019**

Fecha de concesión:

**04.05.2020**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**11.05.2020**

73 Titular/es:

**BIOVET, S.A. (100.0%)  
C. Luxemburgo, 25, Pol. Ind. Constantí  
43120 CONSTANTÍ (Tarragona) ES**

72 Inventor/es:

**BORRELL VALLS, Jaime**

74 Agente/Representante:

**SALVÀ FERRER, Joan**

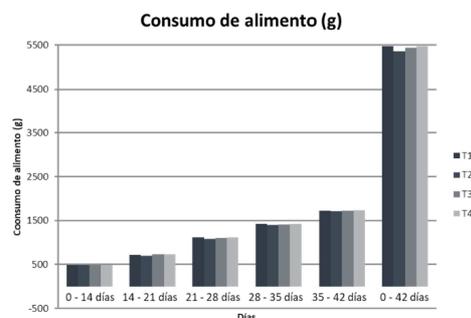
54 Título: **PRODUCTO ALIMENTICIO PARA ANIMALES QUE COMPRENDE CARVACROL, P-CIMENOL Y ALÍINA, Y PROCEDIMIENTO PARA SU OBTENCIÓN**

57 Resumen:

Producto alimenticio para animales que comprende Carvacrol, P-Cimenol Y Aliína, y procedimiento para su obtención.

La presente invención se refiere a un producto alimenticio para animales que comprende carvacrol, p-cimenol y aliína. La presente invención también se refiere a un procedimiento para la obtención del producto alimenticio para animales que comprende carvacrol, p-cimenol y aliína.

Figura 1



ES 2 730 385 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

## DESCRIPCIÓN

### PRODUCTO ALIMENTICIO PARA ANIMALES QUE COMPRENDE CARVACROL, P-CIMENOL Y ALIÍNA, Y PROCEDIMIENTO PARA SU OBTENCIÓN

5

#### Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la alimentación en animales. En particular, se refiere a un producto alimenticio para animales que comprende carvacrol, p-cimenol y aliína, y a su proceso de obtención.

10

#### Antecedentes de la invención

Es conocido que en la alimentación de animales llegan al intestino elevadas cantidades de proteínas no digeridas, las cuales al no estar digeridas no pueden ser absorbidas y, por otro lado, son aprovechadas por bacterias patógenas, como *Clostridium*, que sí las metabolizan. Esto provoca que aumenten las poblaciones de *Clostridium*, reduciendo la población de biota propia del intestino. Por consiguiente, el intestino funcionará de una manera no correcta, e incluso en algunos casos pueden llegar a producirse diarreas.

20

La presente invención proporciona un producto novedoso con un contenido en sus principios activos que ayuda a mejorar el estado fisiológico de las células epiteliales del intestino y por consiguiente, la digestión de alimentos. Los presentes inventores han obtenido una serie de productos extraídos de extractos vegetales cuya combinación sorprendentemente se ha visto que es óptima para la salud intestinal de animales.

25

La asociación de los tres principios activos de la presente invención (carvacrol, p-cimenol y aliína) permite obtener un producto final con gran capacidad de interacción genómica para la regeneración de los enterocitos, gran capacidad de normalización del estado fisiológico de las células inmunitarias del intestino a través de un mecanismo epigenético por estímulo de los genes de IL-1, IL-12, IL-18 y CXC-quimioquinas y, en último término, mejora sorprendentemente la productividad de las explotaciones ya que se mejora el índice de conversión de los animales (relación existente entre el peso ganado por el animal y el alimento consumido) al mejorarse su bienestar digestivo.

35

Adicionalmente, los presentes inventores han desarrollado un procedimiento para la obtención del producto de la presente invención que permiten obtener un producto el polvo, de fácil conservación y administración, pero que a su vez contiene los contenidos nutricionales de un producto fresco.

5

### **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 representa el consumo de alimento (g) a diferentes intervalos de días para los lotes T1 a T4 según el ejemplo 5.1.

10 La figura 2 representa la ganancia media diaria (g) a diferentes intervalos de días para los lotes T1 a T4 según el ejemplo 5.1.

La figura 3 representa el índice de conversión (relación existente entre el peso ganado por el animal y el alimento consumido) a diferentes intervalos de días para los lotes T1 a T4 según el ejemplo 5.1.

15 La figura 4 representa lesiones según el tipo de *Eimeria* en el día 21 para los lotes T1 a T4 según el ejemplo 5.1.

La figura 5 representa lesiones según el tipo de *Eimeria* en el día 35 para los lotes T1 a T4 según el ejemplo 5.1.

20 La figura 6 representa la cuantificación relativa de los genes transcritos por IL-1 para los lotes A a D según el ejemplo 5.4.

La figura 7 representa la cuantificación relativa de los genes transcritos por IL-12 para los lotes A a D según el ejemplo 5.4.

La figura 8 representa la cuantificación relativa de los genes transcritos por IL-18 para los lotes A a D según el ejemplo 5.4.

25

### **Descripción resumida de la invención**

Un primer objetivo de la invención es un producto alimenticio para animales que comprende carvacrol, p-cimeno y aliína.

30

Un segundo objetivo de la invención se refiere a un procedimiento para la obtención del producto alimenticio según el primer aspecto de la invención.

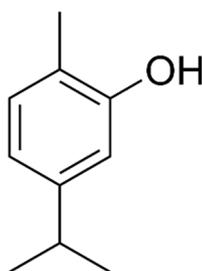
**Descripción de la invención**

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un producto alimenticio para animales que comprende carvacrol, p-cimenol y aliína. Preferiblemente, dicho animal se refiere a animales de producción ganadera que incluyen, sin limitarse a los mismos, rumiantes, ganado porcino y aves.

En una realización preferida, el carvacrol está presente en como mínimo el 3,4% en peso en el producto alimenticio de la invención. Dicho carvacrol está contenido preferiblemente en harina de *Origanum vulgare*, más preferiblemente está contenido en un porcentaje en peso entre el 17 y el 20% en peso.

El carvacrol también se denomina cimofenol y presenta la siguiente fórmula:

15



20

carvacrol

El carvacrol inhibe el crecimiento y elimina un elevado número de patógenos que producirían toxinas dañinas en el intestino. Algunos de estos patógenos se asocian con gastroenteritis, diarreas hemorrágicas, fallo renal, entre otros trastornos o enfermedades. El carvacrol daña la integridad de la pared celular de estas bacterias. Es particularmente interesante indicar que el carvacrol tiene muy poca o escasa interacción con la flora probiótica del intestino. A concentraciones en que inhibe el crecimiento de bacterias patógenas entre el 97 y el 100 % solo afecta a las bacterias probióticas entre un 3 y un 5 %.

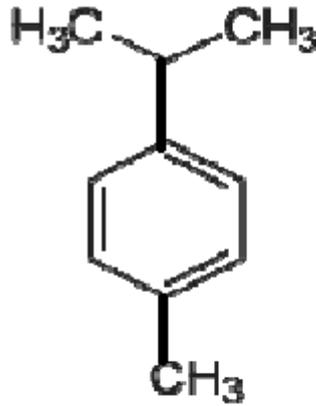
30

En otra realización preferida, el p-cimenol está presente en como mínimo el 2,8% en peso en el producto alimenticio de la invención. Dicho p-cimenol está contenido preferiblemente en un extracto de *Thymus vulgaris*, más preferiblemente está contenido en un porcentaje en peso entre el 14 y el 16% en peso.

35

El p-cimenol es un compuesto cuyas funciones como bactericida, fungicida y conservante son conocidas y está presente en muchas variedades botánicas, entre ellas *Thymus vulgaris*.

5



10

15

p-cimenol

Los ensayos *in vitro* y las pruebas de campo indican que el anillo cimenol es efectivo contra bacterias, levaduras y hongos patógenos del aparato digestivo cuyo mecanismo de acción es el siguiente:

20

#### *Mecanismo de acción en bacterias*

25

El contacto con el anillo cimenol provoca en las bacterias la liberación inmediata del contenido celular al medio, causada por la perforación de la membrana bacteriana que lleva a la destrucción de la célula.

30

A nivel intracelular el anillo cimenol afecta las rutas biosintéticas del ATP (molécula imprescindible para el metabolismo energético), el pH celular y el equilibrio de los iones inorgánicos.

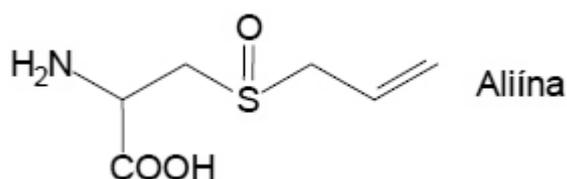
#### *Mecanismo de acción en levaduras y hongos*

35 Sobre levaduras y hongos, concentraciones adecuadas de anillo cimenol consiguen eliminar el 100% de microorganismos en tan solo 10 minutos de contacto. Se observa lisis de las células y liberación del contenido celular al medio. Al microscopio electrónico,

levaduras y hongos presentan deformidades y fracturas en las paredes celulares, sobretodo los que se encuentran en la fase de proliferación.

Adicionalmente, el anillo cimenol inhibe la biosíntesis de ergosterol, el esteroI más importante de la membrana celular de las levaduras, contribuyendo a la destrucción de la célula.

En aún otra realización preferida, la aliína está presente en como mínimo el 7,8% en peso en el producto de la invención. Dicha aliína está contenida en un extracto de *Allium sativum*, más preferiblemente está contenida en un porcentaje en peso entre el 13 y el 14% en peso.



15 El bulbo subterráneo de *Allium sativum* (comúnmente ajo) contiene numerosos componentes activos, entre los que destacan los compuestos azufrados. Si el bulbo está intacto y fresco el compuesto mayoritario es el sulfóxido de S-alil-cisteína o Aliína. Este es un compuesto inestable que se hidroliza por acción de la enzima Alinasa que también está presente en el bulbo. Se obtiene la Alicina. Dicha alicina a su vez también es un compuesto elevadamente volátil. La aliína está presente en el citosol, que también es el sustrato de la enzima alinasa que se encuentra en vacuolas separadas. Cuando el ajo es machacado, las vacuolas que contienen la enzima se rompen y tiene lugar la reacción con la aliína para formar un producto intermedio que condensa para dar la alicina.

25 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de un producto alimenticio para animales que comprende carvacrol, p-cimenol y aliína, que comprende las etapas de:

- 30 (a) obtener un extracto de carvacrol de las hojas de *Origanum vulgare*;  
 (b) obtener un extracto de p-cimenol de las hojas de *Thymus vulgaris*;  
 (c) obtener un extracto de aliína del bulbo de *Allium sativum*;  
 (d) mezclar los extractos de las etapas (a), (b) y (c) hasta homogeneidad.

35 Preferiblemente, la etapa (a) comprende las siguientes subetapas:

- (a1) molturar y secar las hojas de *Origanum vulgare* para obtener un producto en polvo;

- (a2) macerar el polvo obtenido en (a1) en etanol, preferiblemente, durante 4 horas;
- (a3) solidificar la oleorresina obtenida en (a2) por absorción con gel de sílice y evaporar el disolvente, preferiblemente, manteniendo la misma temperatura
- (a4) centrifugar, preferiblemente, se centrifuga a 6000 rpm durante 30 minutos.
- 5 (a5) descartar fase acuosa.

De este modo se obtiene el extracto de carvacrol.

Preferiblemente, la etapa (b) comprende las siguientes subetapas:

- 10 (b1) prensar en frío las hojas de *Thymus vulgaris*;
- (b2) suspender en agua el extracto obtenido en (b1);
- (b3) destilar el aceite del extracto de las hojas;
- (b4) extraer el aceite de la fase acuosa;
- (b5) extraer con una base el contenido fenólico del aceite y solubilizarlo en agua;
- 15 (b6) extraer el p-cimeno con éter;
- (b7) evaporar el éter.

De este modo se obtiene el extracto de p-cimeno.

- 20 Preferiblemente, la etapa (c) comprende las siguientes subetapas y no requiere de ninguna etapa de hidrólisis:
- (c1) suspender los dientes de *Allium sativum* en aceites vegetales, preferiblemente aceite de girasol, a presión negativa y moler;
- (c2) filtrar para separar las pieles
- 25 (c3) dejar reposar y decantar aproximadamente la mitad del volumen de la fase oleosa;
- (c4) añadir una solución acuosa de ácido cítrico 0,5-1,5 mM, preferiblemente 1 mM;
- (c5) tratar con p-hidroxibenzoato de etilo en proporción 1:5 y un emulsionante;
- (c6) homogeneizar entre 30-35 minutos;
- (c7) utilizar una bentonita para absorber la fase líquida y obtener el extracto de aliína en
- 30 polvo.

Mediante esta etapa (c) se obtiene un extracto de *Allium sativum* que conserva intacto el contenido de aliína y alinasa de manera que el proceso bioquímico de conversión de aliína en sus derivados se produce al entrar el producto en contacto con la saliva, cuyas

35 condiciones son las idóneas para la activación de la enzima para la hidrólisis de alinasa, de manera que los beneficios de los pronutrientes contenidos en *Allium sativum* son

máximos, ya que la concentración de los mismos equivaldría a ingerirlo en crudo sin pérdidas. Esto permite mejorar la oferta, con amplia aplicación en la industria alimenticia animal a base de sustancias autorizadas como aditivos alimentarios.

- 5 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante referencia a los siguientes ejemplos sin que los mismos representen una limitación del alcance de la presente invención.

## EJEMPLOS

10

### **Ejemplo 1. Obtención de carvacrol a partir de *Origanum vulgare***

En primer lugar, se realizó un despalillado de la planta de orégano (*Origanum vulgare*) para separar las hojas de las partes leñosas de la misma. Las hojas de *Origanum vulgare* se  
15 molturaron y se secaron para facilitar la extracción etanólica posterior. Este extracto podría considerarse ecológico al no tener ningún tipo de tratamiento químico.

Se maceraron 100 kilos de polvo seco de hojas *Origanum vulgare* con etanol al 96 % en una proporción 1:3 p/v durante 4 horas. Se obtuvo un producto con la consistencia de una  
20 oleorresina que es necesario adsorber con gel de sílice y procesar en el rotavapor a 6.000 rpm durante 30 minutos.

100 kilos de producto en polvo tienen un rendimiento de 12 kg de extracto rico en carvacrol (17-20 %). Se llevó a cabo una estandarización del extracto para comprobar la pureza y  
25 riqueza del mismo.

### **Ejemplo 2. Obtención de p-cimenol a partir de las hojas de *Thymus vulgaris***

Para la obtención de p-cimenol ecológico se realizó un prensado en frío de hojas de tomillo  
30 seco y molido. La torta obtenida contiene aproximadamente un 4 % de p-cimenol.

Para obtener una mayor concentración de principio activo, la torta anterior se introdujo en un balón con agua suficiente para lograr la suspensión de la muestra. Esto suele ser una proporción de 1 kilo de tomillo seco en 3 litros de agua. Se busca la menor manipulación  
35 posible de la muestra con el objetivo de no degradar los aceites esenciales que son la fuente principal del compuesto a purificar. Por ello, para la extracción del aceite esencial

de tomillo se usó una destilación con arrastre de vapor. Debido a la volatilidad y la insolubilidad del aceite en agua se esperará que el producto presente dos fases.

Posteriormente se hizo una extracción para separar el aceite esencial puro con un embudo  
5 de separación. Se separó el aceite esencial en un recipiente tapado y protegido de la luz para evitar la descomposición lumínica. Con la parte acuosa se realizó una nueva extracción con éter para lograr así separar finalmente los excedentes de aceite que queden solubilizados en esta fase. De la fase etérea se extrajeron las trazas de agua remanente con sulfato de sodio como desecante. Para reducir la cantidad de componentes a separar  
10 mediante cromatografía se realizó una extracción ácido-base.

Para la obtención de los fenoles, entre los cuales el p-cimeno, que son los compuestos de mayor acidez en el aceite esencial, se realizó una extracción ácido-base. En primer lugar, se colocó en el embudo de separación los aceites obtenidos junto con agua destilada. A  
15 continuación, se añadieron 50 ml de hidróxido de potasio 1N haciendo que los fenoles, por ser los compuestos más ácidos presentes en el aceite, sean solubles en la fase acuosa.

Una vez aislada la fase acuosa del resto se llevó a un nuevo embudo de separación para su acidificación con 15 ml ácido clorhídrico 2N y se agregaron 100 ml de éter. De esta  
20 manera, se obtuvieron solamente los fenoles en fase etérea. Se juntaron todas las fases etéreas y se filtraron con sulfato de sodio anhidro como desecante para eliminar las trazas de agua. Posteriormente se llevó el compuesto a calentar en baño maría para evaporar el éter y obtener así los fenoles aislados. Al igual que con la proteasa, este aceite es absorbido con una bentonita, lo que permite tener el producto en un polvo fino con un 14-  
25 16 % de p-cimeno. Se llevó a cabo una estandarización del extracto para comprobar la pureza y riqueza del mismo.

### **Ejemplo 3. Obtención de aliína a partir de los bulbos de *Allium sativum***

30 Para obtener aliína ecológica, sin tratamientos químicos, se realizó la extracción en aceite vegetal de girasol, que al evitar el contacto con el aire, minimiza la hidrólisis del compuesto por acción de la alinasa. Se pusieron los dientes de ajo enteros en el aceite y se realizó la molienda en un ambiente con presión negativa para evitar al máximo la presencia de oxígeno. Terminado esto se filtró para separar las pieles. El producto contiene 5 % de  
35 aliína.

Para incrementar la concentración de aliína a partir de esta emulsión se realizó una concentración de aliína. Para ello, se dejó reposar durante 2 horas y se decantó la parte oleosa reduciendo su volumen a la mitad. Se añadió una solución acuosa de ácido cítrico 1 mM y se trató la emulsión restante con p-hidroxibenzoato de etilo en una proporción de 1:5 y un emulsionante y se homogeneizó durante 30 minutos. De este modo, se obtuvo un extracto de *Allium sativum* con una riqueza de aliína de 13-14 %.

#### **Ejemplo 4. Obtención del producto alimenticio de la invención.**

Una vez todos los principios activos han sido purificados, previo análisis cuantitativo para comprobar las concentraciones, se llevó a cabo la preparación del producto final.

Esta preparación tuvo lugar por mezcla simple de los extractos para obtener el producto en forma de líquido.

15

Para la preparación del alimento en polvo, se pusieron 75 kilos de harina de *Allium sativum*, 25 kilos de harina de *Origanum vulgare* y 25 kilos de harina de *Thymus vulgaris*. Se mezclaron durante 6 minutos, momento en que se puede asegurar la homogeneidad del producto. En este momento, se realizó una molturación del producto para garantizar una granulometría apropiada para el uso en instalaciones industriales, que serán los usuarios finales del producto. El alimento complementario obtenido por la incorporación de ingredientes naturales de plantas aromáticas está listo para ser consumido con una composición mínima garantizada del 3,4 % de carvacrol, 2,8 % de cimenol y 7,8 % de aliína. Se envasó adecuadamente.

25

#### **Ejemplo 5. Prueba de eficacia**

Existen una serie de protozoos, las coccidias, que infestan los tejidos epiteliales de los intestinos causando serias pérdidas económicas. Actualmente las infecciones por coccidias se tratan mediante la administración de coccidiostáticos químicos o bien por vacunación.

Para demostrar la eficacia del producto de la invención frente a coccidias, se han realizado varios tests, que comparan el uso del producto de la invención con los métodos actualmente usados.

35

**Ejemplo 5.1.** El primero de ellos se realizó en Escocia y se testeó la eficacia del producto de la invención frente a diversas especies de coccidia llamadas *Eimeria*, en concreto a *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella*, *E. necatrix* en pollos de engorde

5 El diseño del mismo se esquematiza de la siguiente manera:

ANIMALES: 960 pollos de engorde en 4 grupos de tratamiento distribuidos en 32 galpones de 30 animales (8 galpones por tratamiento). Se infectaron animales de 2 semanas de vida experimentalmente con ooquistes patógenos de: *Eimeria tenella*, *E. acervulina*, *E. maxima*  
10 y *E. necatrix*

PARÁMETROS EVALUADOS:

- Consumo de alimento (véase la figura 1)
- Ganancia media diaria (véase la figura 2)
- 15 - Índice de conversión (véase la figura 3)
- Severidad de las lesiones intestinales los días 21 y 35 (días 7 y 14 post-infección) (véanse las figuras 4 y 5)
- Ooquistes por gramo (día 20, 22 y 28).
- La gravedad de las lesiones intestinales se evaluó en una escala del 0 al 4.

20

TRATAMIENTOS:

- Tratamiento 1 (T1): No infestados y no tratados (NINT)
- Tratamiento 2 (T2): Infestados no tratados (INT)
- Tratamiento 3 (T3): Producto de la invención a 0.5 kg/T desde el día 0 hasta el  
25 sacrificio (INV0.5).
- Tratamiento 4 (T4): Producto de la invención a 1 kg/T desde el día 0 hasta el sacrificio (INV1).

Los resultados obtenidos para cada uno de los parámetros evaluados son los siguientes:

30

Tabla 1: Consumo de alimento (g) (véase también la figura 1)

35

Lote	0 – 14 días	14 – 21 días	21 – 28 días	28 – 35 días	35 – 42 días	0 – 42 días
T1	488,08	722,92	1114,83	1417,33 b	1725,88	5469,04
T2	481,38	693,83	1076,04	1389,12 a	1709,25	5349,63
T3	487,12	727,69	1097,77	1395,86 ab	1726,62	5435,07
T4	483,42	728,42	1113,79	1419,00 b	1728,50	5473,12

Tabla 2: Ganancia media diaria (g) (véase también la figura 2)

Lote	0 – 14 días	14 – 21 días	21 – 28 días	28 – 35 días	35 – 42 días	0 – 42 días
T1	417,04	471,96	685,50 b	779,00 bc	873,88	3228,38
T2	411,25	396,38	656,12 a	765,25 a	869,75	3098,75
T3	417,88	478,13	678,75 b	769,50 ab	878,12	3222,38
T4	417,71	478,25	688,79 b	782,54 c	880,12	3247,42

5

Tabla 3: Índice de conversión (véase también la figura 3)

Lote	0 – 14 días	14 – 21 días	21 – 28 días	28 – 35 días	35 – 42 días	0 – 42 días
T1	1,17	1,532	1,624	1,819	1,975	1,694 b
T2	1,171	1,754	1,640	1,815	1,965	1,726 a
T3	1,165	1,524	1,617	1,814	1,966	1,687 b
T4	1,157	1,522	1,617	1,813	1,964	1,685 b

10

a,b,c: coeficientes estadísticos que indican las diferencias significativas que hay entre los diferentes grupos

### CONCLUSIONES:

15

1. A pesar de la infestación, los lotes con **el producto de la invención** obtienen **la misma ganancia diaria (0.5 kg/Tm) o incluso superior (1kg/Tm)** que el lote NINT. La ganancia media diaria es mejor que la del grupo INT.

20

2. A pesar de la infestación, con **el producto de la invención** se obtienen **índices de conversión parecidos** al grupo control (NINT). El índice de conversión es superior que en el lote INT.

**3. El lote INT** muestra una **disminución del consumo de alimento** durante la 3ª y 4ª semana de vida de los animales. Esto es debido a que la infestación ha producido una enfermedad y que, como consecuencia, el peso final y el índice de conversión de este lote es peor que en el lote con **el producto de la invención**.

5

**4.** Los parámetros productivos se mantienen con **el producto de la invención** a pesar de tener lesiones de mayor gravedad que en el lote control (NINT). Esto es debido a que **el producto no evita la infestación celular, pero promueve la eliminación de los coccidios**.

10

**Ejemplo 5.2.** Esta segunda prueba se llevó a cabo por comparación del producto de la presente invención contra los coccidiostáticos químicos en avicultura industrial en Rumania.

15

Diseño del test:

TIPO DE ESTUDIO: En granjas propias, al azar

ANIMALES: Broilers, Cobb, 0 a 42 días de edad.

El estudio se desarrolló en tres granjas distintas: A, B y C

20

PARÁMETROS EVALUADOS:

- Presencia de coccidios
- Ganancia de peso diaria
- Media de peso
- Mortalidad

25

• GRANJA A (TRATAMIENTO CON PRODUCTO de la invención 0.250 kg/T desde el día 0 hasta el sacrificio.)

- 4 edificios
- EDIFICIO 1: 19320 animales.
- EDIFICIO 2: 19350 animales.
- Otros edificios no usados

30

• GRANJA B (TRATAMIENTO CON COCCIDIOSTATICOS QUIMICOS: Diclazurilo 200g/T, 0 a los 20 días, Lasalócido 600 g/T, 21 a los 35 días. Periodo de supresión, 35 a los 42 días)

35

- 10 edificios
- EDIFICIO 3: 16950 animales.
- EDIFICIO 4: 16950 animales.
- Otros edificios no usados

5

• GRANJA C (TRATAMIENTO CON PRODUCTO de la invención 0.500 kg/T desde el día 0 hasta el sacrificio)

- 10 edificios
- EDIFICIO 5: 16800 animales.
- 10 - EDIFICIO 6: 16300 animales.
- Otros edificios no usados

RESULTADOS:

1.- PRESENCIA DE COCCIDIOS:

- 15 - GRANJA A: Los coccidios aparecen el día 19 en el edificio 1 y en el día 25 en el edificio 2.
- GRANJA B: Los coccidios aparecen el día 24 en el edificio 3 y en el día 25 en el edificio 4.
- GRANJA C: No aparecieron coccidios

20

Tabla 4.- CRECIMIENTO DIARIO (g/día):

Semana		1	2	3	4	5	6
Estándar tecnológico		17,6	38,0	59,0	79,1	88,6	87,0
GRANJA A	B1	15,7	39,7	58,6	65,7	52,8	75,8
	B2	14,7	36,7	58,3	51,4	42,8	68,0
GRANJA B	B3	15,4	36,3	56,1	71,8	57,8	81,1
	B4	15,7	35,4	57,8	71,4	59,3	82,8
GRANJA C	B5	15,6	39,4	67,0	72,1	76,4	81,0
	B6	15,4	37,4	80,0	80,0	74,4	81,0

Tabla 5.- MEDIA DE PESO (g):

25

Semana		1	2	3	4	5	6
Estándar tecnológico		164	430	843	1397	2017	2626
GRANJA A	B1	152	430	840	1300	1670	2201
	B2	145	402	810	1170	1474	1950
GRANJA B	B3	150	406	797	1300	1705	2273
	B4	152	400	805	1305	1720	2300
GRANJA C	B5	151	427	897	1402	1937	2504
	B6	150	412	883	1443	1964	2531

Tabla 6. MORTALIDAD:

Semana		1	2	3	4	5	6	Acumu- lada
GRANJA A	B1	0,65	0,38	0,30	1,19	1,55	0,45	4,52
	B2	1,7	0,30	0,68	2,26	0,99	0,55	6,56
GRANJA B	B3	0,81	0,48	0,24	0,87	1,38	0,49	4,27
	B4	0,68	0,38	0,33	1,16	1,17	0,58	4,3
GRANJA C	B5	0,41	0,30	0,36	0,51	0,62	1,62	3,8
	B6	0,74	0,33	0,27	0,50	0,53	1,19	3,56

CONCLUSIONES:

- 5 1. Los mejores resultados se obtuvieron en la granja C con el producto de la invención a dosis de 0,5 kg/T.
2. En la granja C con el producto de la invención a dosis de 0,5 kg/T es la única donde no se observa coccidiosis.
3. En la granja C con el producto de la invención a dosis de 0,5 kg/T se consigue mejor
- 10 peso y menor mortalidad.
4. El producto de la invención es efectivo como optimizador de la mucosa intestinal con mejores resultados que los coccidiostáticos químicos.

Si comparamos los resultados de la granja con la granja B (coccidiostáticos químicos),  
 15 podemos concluir que con el producto de la invención se consigue, por cada 1.000.000 broilers, una producción de 231 toneladas más de carne.

**Ejemplo 5.3.** Esta tercera prueba se llevó a cabo por comparación del producto contra las vacunaciones contra coccidiosis en avicultura industrial en El Salvador.

## Diseño del test:

- Granja de 83000 pollitas, de 1 a 16 semanas
- Producto de la invención contra vacunación.
- Distribución de los lotes:

5

Edificio 2B

Producto de la invención/sin vacunación

16.561 animales

Media de peso: 36 g

Edificio 3B

Sólo vacunación

15.952 animales

Media de peso: 36 g

Tabla 7

Semana	Edificio 2B Producto de la invención				Edificio 3B Vacunación			
	Peso (g)	% mort	Uniformidad	Consumo alimento (g)	Peso (g)	% mort	Uniformidad	Consumo alimento (g)
1	69	0,16	94	47	68	0,14	80	57
2	102	0,41	76	143	101	0,35	73	151
3	161	0,61	91	259	155	0,59	85	271
4	234	0,45	96	375	226	1,06	100	436
5	320	1,24	87	584	311	1,75	96	562
6	421	1,20	92	849	392	1,87	93	836
7	497	1,41	87	1137	484	2,60	86	1113
8	617	1,48	92	1468	605	2,71	89	1411
9	724	1,50	84	1820	730	2,79	89	1768
10	819	1,66	90	2168	813	2,88	94	2119
11	894	1,76	90	2592	867	2,91	83	2512
12	1015	1,84	94	2926	988	2,96	95	2930
13	956	2,00	89	3252	1008	3,05	89	3260
14	1124	2,22	100	3302	1130	3,09	89	3312
15	1130	2,38	96	3359	1164	3,16	85	3370
16	1211	2,53	90	3420	1267	3,20	85	3429

CONCLUSIONES:

- 10 • La administración del producto de la invención consigue, comparado con la vacunación:
- ✓ Menor mortalidad (%), 2,53 % frente a 3,20

✓ Mayor uniformidad, 90 % frente 85 %, entendiéndose por uniformidad la desviación del peso del animal con respecto al peso medio del grupo, es decir la homogeneidad del peso dentro de un grupo)

✓ Peso e índice de conversión parecidos

5

**Ejemplo 5.4.** Esta cuarta prueba recoge el informe técnico del proyecto para el análisis de las respuestas a nivel molecular de un optimizador intestinal.

#### 5.4.1. Obtención de muestras de sangre

10 En primer lugar se obtuvieron varias muestras de sangre de aves adultas sanas, realizando tres grupos independientes.

#### 5.4.2. Obtención de fracción de PMNs

15 Una vez obtenidas las muestras de sangre heparinizada, se procedió al aislamiento de la fracción celular correspondiente a las células polimofmonucleares (PMNs) mediante la aplicación de un gradiente de ficoll. Para ello, se añadieron 12 ml de sangre diluida 1:1 en SBS (Salts Balanced Solution) sobre 9 ml de Ficoll-Paque PLUS sin mezclar ambas fases. Tras centrifugar a 400gs durante 40 min a 20°C, la fase de PMNs se transfirió a un nuevo  
20 tubo con una pipeta pasteur y se realizaron 3 lavados con 3V de SBS (100gs, 10 min, 20°C). Los PMNs de varias extracciones se resuspendieron en el volumen apropiado de medio DMEM suplementado con suero fetal bovino y se añadieron en placas de cultivo celular de 12 pocillos para obtener densidades de aproximadamente  $10^5$ - $10^6$  células/pocillo.

25

#### 5.4.3. Obtención de esporozoitos de *Eimeria*

Mediante la colaboración con un laboratorio de parasitología, se obtuvieron inóculos de aproximadamente  $10^5$ /ml de esporozoitos de las especies *Eimeria acervulina*, *Eimeria*  
30 *maxima*, *Eimeria praecox* y *Eimeria tenella*.

#### 5.4.4. Tratamientos

Se realizaron los siguientes tratamientos *in vitro*:

- 1- Control negativo: PMN + medio DMEM (37°C 5%CO<sub>2</sub> 3 horas)- 3 muestras
- 35 2- Tratamiento *Eimeria*: PMN+ esporozoitos de *Eimeria* 10:1 aproximadamente en medio DMEM (37°C 5% CO<sub>2</sub> 3 horas)- 3 muestras

3- Tratamiento con producto de la invención: PMN + producto de la invención a una dilución 1:10.000 en medio DMEM (37°C 5% CO<sub>2</sub> 3 horas)- 3 muestras

4- Tratamiento con el producto de la invención + *Eimeria*: PMN + producto de la invención (37°C 5% CO<sub>2</sub> 1 horas) + esporozoitos de *Eimeria* 10:1 aprox. en medio DMEM

5 (37°C 5% CO<sub>2</sub> 2 horas)- 3 muestras

#### 5.4.5 Obtención de ARN, ADNc y qPCR de genes clave en respuestas frente patógenos intracelulares como *Eimeria*

10 Se hizo una extracción del ARN de los PMNs tras los tratamientos y se sintetizó el ADNc.

Cada muestra de ADNc se utilizó como molde para una PCR cuantitativa con el fin de analizar la variación transcripcional de los siguientes genes:

- 15 - ILs 1, 12, 18: interleukinas pro-inflamatorias relevantes en procesos de infección por organismos intracelulares
- GAPDH: gene housekeeping

Los resultados se analizaron mediante normalización de diferencia de ciclos con respecto al gen housekeeping (GAPDH), utilizando el cálculo DcT.

20

Resultados para IL-1 (véase la figura 6), IL-12 (véase la figura 7), IL-18 (véase la figura 8)

A: CONTROL

25 B: Producto de la invención 1: 10.000

C: *Eimeria* 1:10

D: Producto de la invención+ *Eimeria*

IL-1:

- 30 - Promueve la secreción de quimiocinas y citoquinas por parte de fibroblastos, macrófagos y células epiteliales.
- Atrae otras células inflamatorias, como macrófagos, heterófilos y linfocitos.
- Amplifica la respuesta inmune.

35 IL-12:

- Desencadena la respuesta inmune Th1 (linfocitos T), que también tiene un rol

importante en la lucha contra la coccidiosis (inmunidad adaptativa).

- Activa las células NK (citotoxicidad) y los macrófagos (fagocitosis).
- Incrementa la duración de la respuesta inmune celular.

5 IL-18:

- Induce la activación de células NK y linfocitos T citotóxicos.
- Estimula la producción de interferón gamma (activación de macrófagos y respuesta inmune Th1).
- Incrementa el efecto de la IL-12.

10

#### CONCLUSIONES:

Las propiedades de inmuno-estimulación que muestra el producto de la invención pueden deberse, entre otros efectos, a la inducción de las interleukinas pro-inflamatorias IL-1, IL-12 e IL-18 a nivel transcripcional. Estas moléculas son esenciales para combatir

15

infecciones por parásitos intestinales como *Eimeria*:

- IL-1 sintetiza quimiocinas y citoquinas para atraer células inflamatorias
- IL-12 y IL-18 promueven la activación de la respuesta inmune celular

Existe una mayor expresión de IL-1, IL-12 e IL-18 cuando se administra el producto de la invención (en comparación con el control).

20

Existe una mayor expresión de IL-1 y IL-12 cuando la infección por *Eimeria* ocurre tras la exposición al producto de la invención.

## REIVINDICACIONES

- 1.- Producto alimenticio para animales que comprende carvacrol, p-cimenol y aliína.
- 5 2.- Producto alimenticio, según la reivindicación 1, en el que el carvacrol está presente en como mínimo el 3,4% en peso en dicho producto.
- 3.- Producto alimenticio, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el p-cimenol está presente en como mínimo el 2,8% en peso en dicho producto.
- 10 4.- Producto alimenticio, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la aliína está presente en como mínimo el 7,8% en peso en dicho producto.
- 5.- Producto alimenticio, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el carvacrol está contenido en harina de *Origanum vulgare*.
- 15 6.- Producto alimenticio, según la reivindicación 5, en el que el carvacrol está presente en la harina de *Origanum vulgare* en un porcentaje en peso entre el 17 y el 20% en peso.
- 20 7.- Producto alimenticio, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el p-cimenol está contenido en un extracto de *Thymus vulgaris*.
- 8.- Producto alimenticio, según la reivindicación 7, en el que el p-cimenol está presente en dicho extracto en un porcentaje en peso entre el 14 y el 16% en peso.
- 25 9.- Producto alimenticio, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la aliína está contenida en un extracto de *Allium sativum*.
- 10.- Producto alimenticio, según la reivindicación 9, en el que la aliína está presente en dicho extracto en un porcentaje en peso entre el 13 y el 14% en peso.
- 30 11.- Procedimiento para la obtención de un producto alimenticio para animales que comprende carvacrol, p-cimenol y aliína, que comprende las etapas de:
- (a) obtener un extracto de carvacrol de las hojas de *Origanum vulgare*;
- 35 (b) obtener un extracto de p-cimenol de las hojas de *Thymus vulgaris*;
- (c) obtener un extracto de aliína del bulbo de *Allium sativum*;

(d) mezclar los extractos de las etapas (a), (b) y (c) hasta homogeneidad.

12.- Procedimiento, según la reivindicación 11, en el que la etapa (a) comprende las siguientes subetapas:

- 5 (a1) molturar y secar las hojas de *Origanum vulgare* para obtener un producto en polvo;
- (a2) macerar el polvo obtenido en (a1) en etanol;
- (a3) solidificar la oleoresina obtenida en (a2) por absorción con gel de sílice y evaporar el disolvente;
- (a4) centrifugar.
- 10 (a5) descartar la fase acuosa.

13.- Procedimiento, según la reivindicación 12, en el que en la etapa (a4) se centrifuga a 6000 rpm durante 30 minutos.

15 14.- Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que la etapa (b) comprende las siguientes subetapas:

- (b1) prensar en frío las hojas de *Thymus vulgaris*;
- (b2) suspender en agua el extracto obtenido en (b1);
- (b3) destilar el aceite del extracto de las hojas;
- 20 (b4) extraer el aceite de la fase acuosa;
- (b5) extraer con una base el contenido fenólico del aceite y solubilizarlo en agua;
- (b6) extraer el p-cimeno con éter;
- (b7) evaporar el éter.

25 15.- Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 11-14, en el que la etapa (c) comprende las siguientes subetapas:

- (c1) suspender los dientes de *Allium sativum* en aceites vegetales a presión negativa y moler;
- (c2) filtrar para separar las pieles
- 30 (c3) dejar reposar y decantar aproximadamente la mitad del volumen de la fase oleosa;
- (c4) añadir una solución acuosa de ácido cítrico 0,5-1,5 mM;
- (c5) tratar con p-hidroxibenzoato de etilo en proporción 1:5 y un emulsionante;
- (c6) homogeneizar entre 30-35 minutos;
- (c7) utilizar una bentonita para absorber la fase líquida y obtener el extracto en polvo.

35

16.- Procedimiento, según la reivindicación 15, en el que en la etapa (c1) el aceite vegetal es aceite de girasol.

17.- Procedimiento, según la reivindicación 15 ó 16, en el que en la etapa (c4) la solución  
5 acuosa de ácido cítrico tiene una concentración de 1 mM.

Figura 1

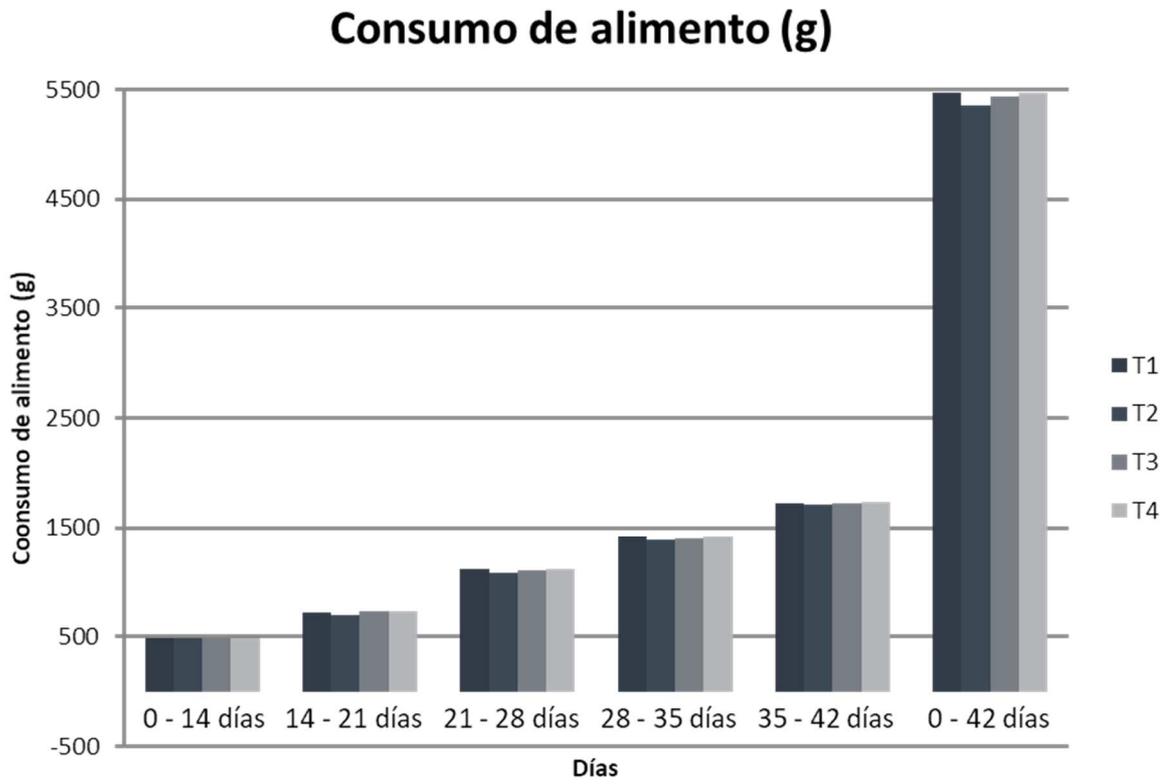


Figura 2

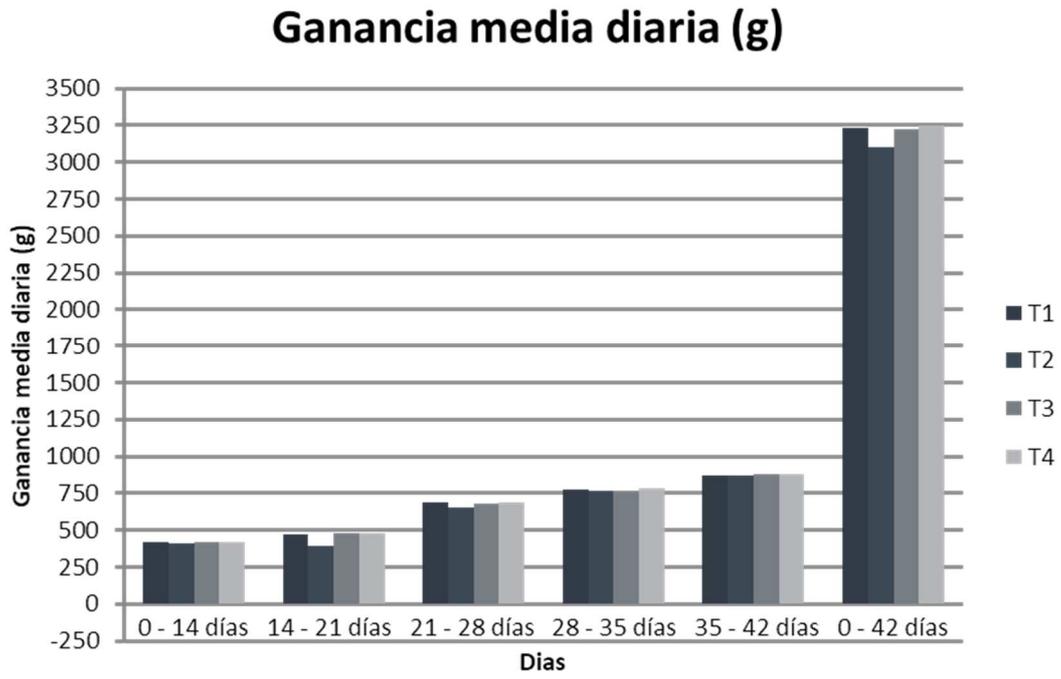


Figura 3

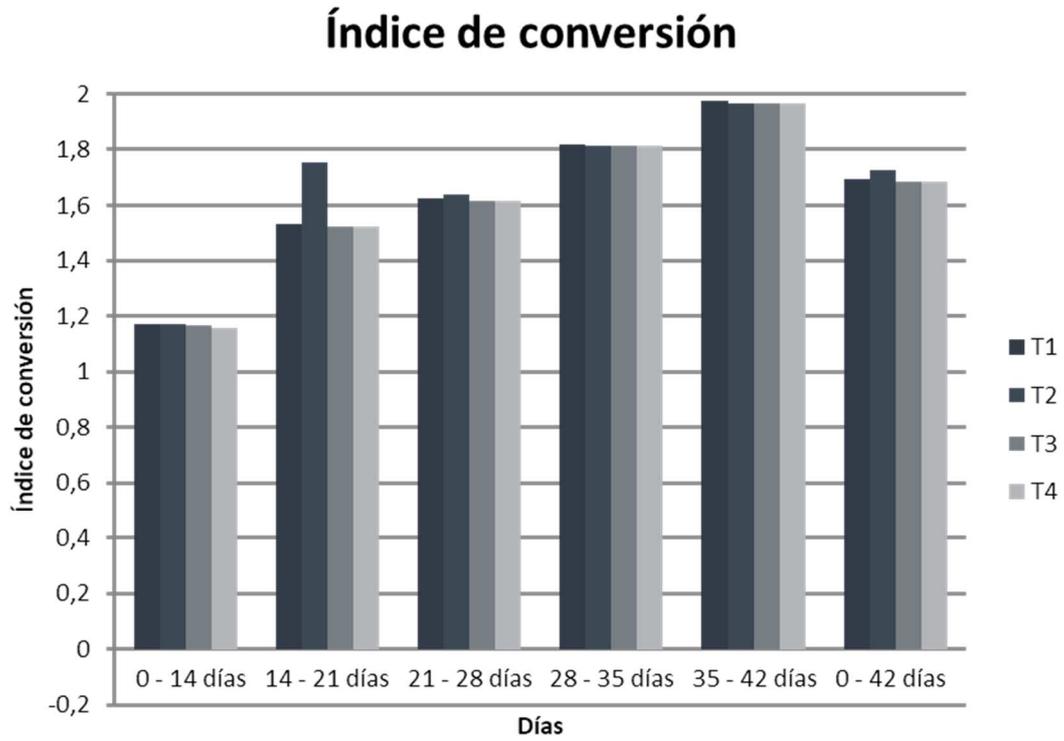


Figura 4

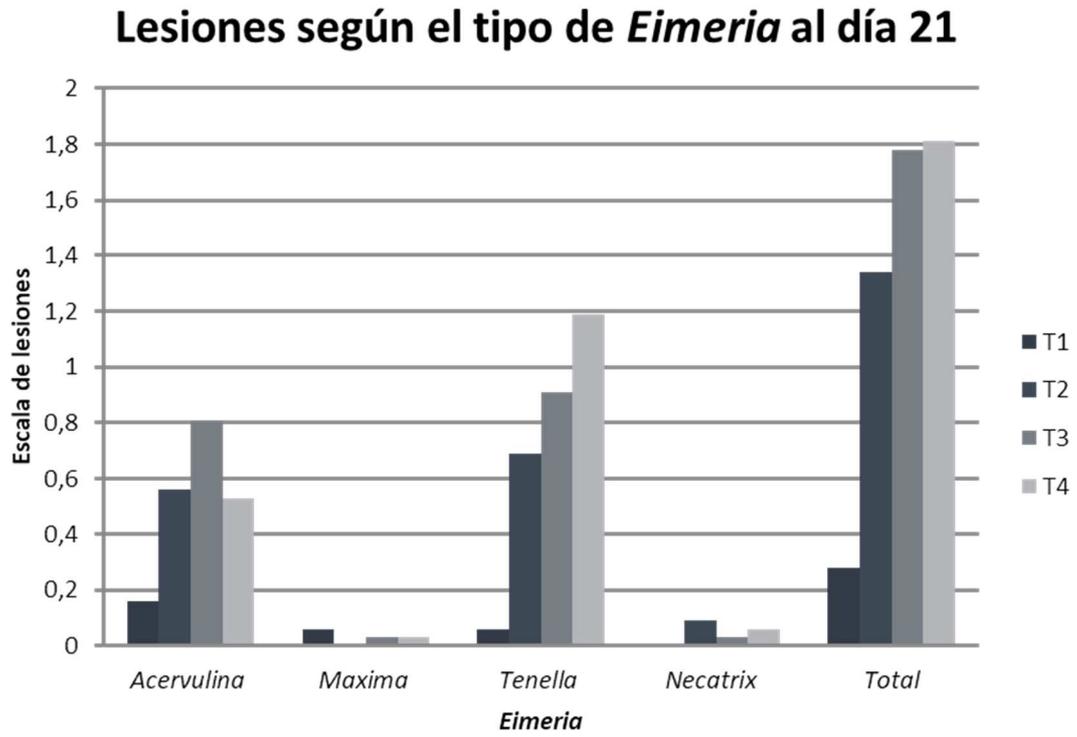


Figura 5

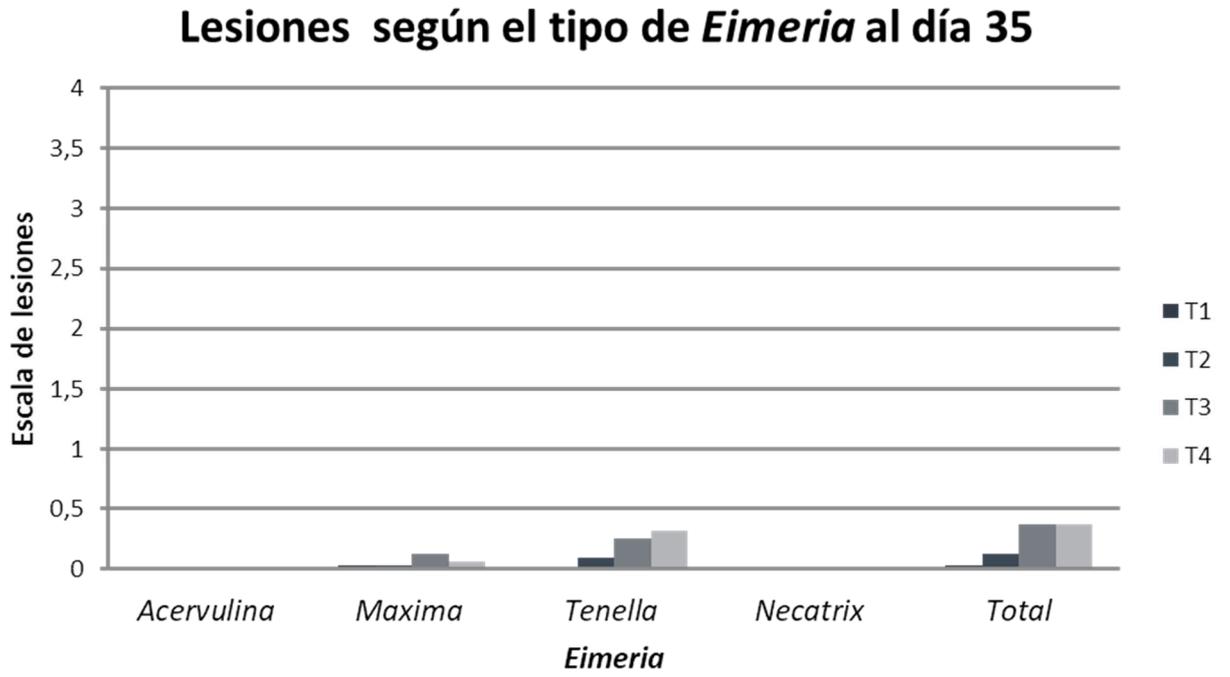


Figura 6

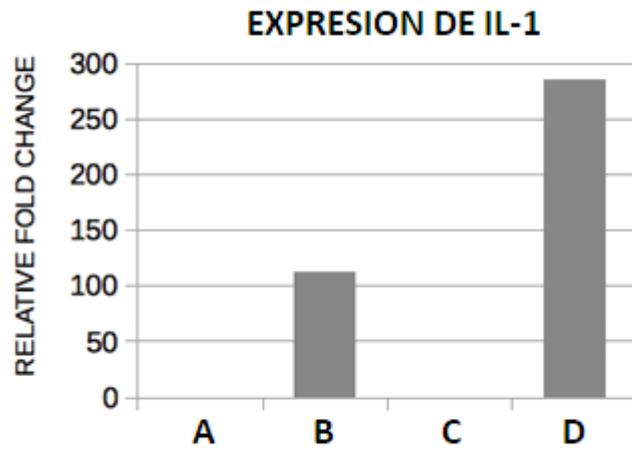


Figura 7

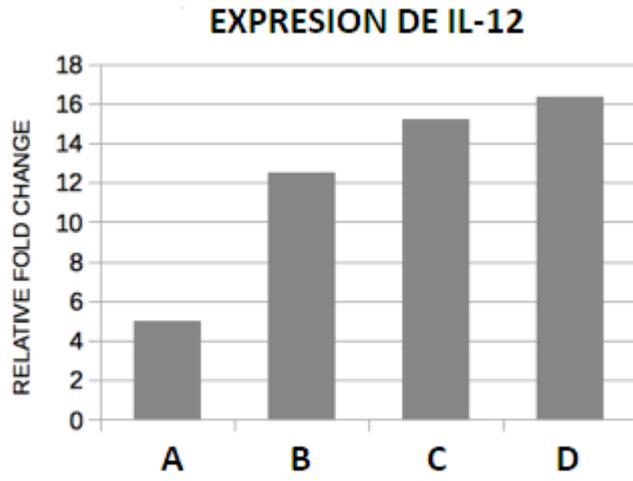


Figura 8

