

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 735 643**

51 Int. Cl.:

A23K 10/00 (2006.01)
G01N 33/02 (2006.01)
G01N 1/40 (2006.01)
G01N 21/3563 (2014.01)
G01N 21/359 (2014.01)
C12Q 1/37 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.02.2014 PCT/US2014/015729**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14149239**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.02.2014 E 14769756 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019 EP 2983493**

54 Título: **Métodos para analizar alimento para animales**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361787842 P
17.12.2013 US 201314109359

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.12.2019

73 Titular/es:

ALLTECH, INC. (100.0%)
3031 Catnip Hill Pike
Nicholasville, KY 40356, US

72 Inventor/es:

MCKINNEY, KYLE;
LOVELL, ALLYSON;
HENRY, BENJAMIN;
BECKER, PATRICK y
TIMMONS, REBECCA, A.

74 Agente/Representante:

MILTENYI , Peter

ES 2 735 643 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

Métodos para analizar alimento para animales

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método para analizar alimentos para animales. En particular, se describen sistemas y métodos *in vitro* para analizar el alimento para animales con respecto al metabolismo de los nutrientes y fuentes de energía.

10

Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

Esta solicitud se presenta el 11 de febrero de 2014 como solicitud de patente internacional PCT y reclama prioridad frente a la solicitud de patente estadounidense con número de serie 61/787.842, presentada el 15 de marzo de 2013, y la solicitud de patente estadounidense con número de serie 14/109.359, presentada el 17 de diciembre de 2013.

15

Antecedentes de la invención

La mayoría de los alimentos para animales tienen como objetivo principal la provisión de al menos un requisito mínimo de nutrición para mantener a los animales a los que se alimenta.

20

El ganado (por ejemplo, bovino, porcino, aves de corral, peces, etc.) ha sido seleccionado en los últimos 20-50 años por sus características específicas, como el crecimiento, el magro y la eficiencia del metabolismo. Así, en los últimos cincuenta años, han cambiado los enfoques para proporcionar nutrición animal. Ya no se alimenta a los animales con cualquier forraje u otro material que pueda estar disponible. En cambio, las dietas de los animales se vigilan de cerca para determinar su valor y coste nutricional total. Muy a menudo, los animales con dietas específicas son supervisados por sus características de calidad y rendimiento, estando los componentes nutricionales del alimento ajustados para maximizar el valor nutricional del alimento y optimizar las características de rendimiento del animal.

25

Existe la necesidad de analizar el alimento para conocer los niveles de nutrientes y determinar si el alimento cumple con los requisitos de energía y nutrientes del animal para el que está destinado. Los métodos de análisis preferidos son eficientes, precisos y rentables.

30

Sumario de la invención

35

La presente invención se refiere a un método para analizar alimentos para animales de acuerdo con la reivindicación 1. En particular, se describen sistemas y métodos *in vitro* para analizar el alimento para animales con respecto al metabolismo de los nutrientes y fuentes de energía.

40

Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método de análisis de alimento para animales, que comprende: a) realizar la digestión *in vitro* en una muestra del alimento para animales para generar alimento para animales digerido; b) analizar el alimento para animales digerido utilizando espectroscopia (por ejemplo, espectroscopia de infrarrojo cercano) para generar datos espectrales; y c) identificar máximas en los datos espectrales para determinar la información máxima del alimento para animales. En algunas realizaciones, la información máxima comprende la identidad y la cantidad de componentes residuales del alimento para animales después de la digestión *in vitro*. En algunas realizaciones, los componentes residuales son uno o más de fósforo, proteínas, hidratos de carbono o energía bruta. En algunas realizaciones, el alimento para animales comprende una enzima (por ejemplo, una enzima digestiva o una enzima involucrada en la digestión del alimento para animales). Las enzimas de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, proteasas, proteasas fúngicas, celulasas, xilanasas, fitasa, fosfatasa ácida, beta-glucanasa, pectinasa o alfa-amilasa. En algunas realizaciones, la identificación se utiliza para determinar el efecto de la enzima sobre la digestibilidad y/o biodisponibilidad del alimento para animales. En algunas realizaciones, la identificación comprende el uso de un ordenador y un *software* informático, en donde el *software* utiliza información máxima generada previamente para determinar la identidad y cuantificación de una máxima en particular.

45

50

55

Un sistema para realizar el método puede comprender: a) un aparato de digestión *in vitro* para llevar a cabo la digestión *in vitro* en una muestra de alimento para animales para generar alimento para animales digerido; b) un espectrómetro para generar espectros del alimento para animales digerido; y c) un ordenador y *software* informático para identificar y cuantificar las máximas de los espectros. El *software* informático determina el efecto de dicha enzima en la digestibilidad del alimento para animales.

60

En este documento se describen realizaciones adicionales.

Descripción de los dibujos

65

La figura 1 muestra un esquema de los métodos de realización de la presente divulgación.

La figura 2 muestra un espectro NIR ejemplar.

La Figura 3 muestra la precisión de un modelo ejemplar de las realizaciones de la presente divulgación.

5 DEFINICIONES

Como se usa en el presente documento, el término p/p (peso/peso) se refiere a la cantidad de una sustancia determinada en una composición en base al peso. Por ejemplo, un alimento para animales que comprende un 0,02 % p/p de suplemento alimenticio dietético significa que la masa del suplemento alimenticio dietético es un 0,02 % de la masa total del alimento para animales (por ejemplo, 200 gramos de composición de suplementos alimenticios dietéticos de la invención en 907,200 gramos de alimento para animales).

Tal como se usa en el presente documento, el término "alga" o "algas" se refiere a cualquier organismo monocelular o multicelular capaz de cultivarse en medios que comprenden agua de mar diluida, pura o concentrada o que se encuentra de forma natural en aguas marinas y que se puede propagar a través de métodos de cultivo o fermentación.

Como se usa en este documento, el término "harina de algas" se refiere a una preparación de material de algas.

Como se usa en el presente documento, el término "conservante" se refiere a un agente que prolonga la vida de almacenamiento de los productos alimenticios y no alimenticios al retardar o prevenir el deterioro del sabor, olor, color, textura, apariencia, valor nutritivo o seguridad. Un conservante no necesita proporcionar una acción letal e irreversible que resulte en la destrucción o incapacidad parcial o completa de las células microbianas. Los esterilizantes, higienizantes, desinfectantes, esporicidas, virucidas y agentes tuberculocidas proporcionan un modo de acción irreversible, a veces denominado acción "bactericida". Por el contrario, un conservante puede proporcionar una acción inhibitoria o bacteriostática que es reversible, ya que los microbios diana pueden reanudar la multiplicación si se elimina el conservante. Las principales diferencias entre un conservante y un desinfectante conllevan principalmente el modo de acción (un conservante evita el crecimiento en lugar de la eliminación de microorganismos) y el tiempo de exposición (un conservante tiene de días a meses para actuar, mientras que un higienizante tiene a lo sumo unos minutos para actuar).

Como se usa aquí, el término "extracto de *Aspergillus niger*" o "extracto fúngico" o "extracto de fermentación de *Aspergillus niger*" o "extracto de fermentación fúngica" se refiere a un producto de la fermentación fúngica. En algunas realizaciones, el organismo utilizado para la fermentación fúngica se encuentra en los géneros *Aspergillus*. En algunas realizaciones, el producto de la fermentación fúngica comprende al menos una enzima. En algunas realizaciones, la actividad enzimática comprende actividad proteasa. Otras actividades, propiedades o componentes enzimáticos o no enzimáticos pueden estar presentes en el producto de la fermentación fúngica. Dichas actividades, propiedades o componentes incluyen, pero no se limitan a la actividad degradante de la celulosa, metabolitos secundarios, actividad antibiótica, actividad promotora del crecimiento o facilitación de la digestión, en particular, en el sistema gastrointestinal de una especie de ganado.

Como se usa en el presente documento, el término "purificado" o "purificar" se refiere a la eliminación de componentes de una muestra. Por ejemplo, las paredes celulares de levadura o los extractos de pared de las células de levadura se purifican mediante la eliminación de los componentes de la pared celular que no son de levadura (por ejemplo, membrana plasmática y/o componentes intracelulares de levadura); también se purifican mediante la eliminación de contaminantes u otros agentes distintos de la pared celular de la levadura. La eliminación de los componentes de la pared celular que no son levadura y/o de los contaminantes de la pared celular que no son levadura produce un aumento en el porcentaje de pared celular de levadura o de los componentes de esta en una muestra.

Como se usa en el presente documento, el término "*in vivo*" se refiere a estudios y/o experimentos realizados dentro de un organismo vivo que se producen dentro de un organismo biológico.

Como se usa en el presente documento, el término "*in vitro*" se refiere a un entorno artificial fuera del organismo vivo y a procesos biológicos o reacciones que normalmente ocurrirían dentro de un organismo pero que se producen en un entorno artificial. Los entornos *in vitro* pueden comprender, pero no se limitan a, tubos de ensayo y cultivo celular.

Como se usa en el presente documento, el término "analito" se refiere a un átomo, una molécula, una agrupación de átomos y/o moléculas, una sustancia o un componente químico. Un analito, en sí y por sí mismo, no puede medirse; más bien, los aspectos o propiedades (físicas, químicas, biológicas, etc.) del analito se pueden determinar mediante un procedimiento analítico, como la HPLC (cromatografía líquida de alta resolución). Por ejemplo, no se puede medir una "silla" (analito-componente) en sí misma, pero se puede medir la altura, el ancho, etc. de una silla.

Como se usa en el presente documento, el término "biodisponibilidad" se refiere a la fracción de una molécula o componente que está disponible para un organismo o que alcanza la circulación sistémica. Cuando una molécula o componente se administra por vía intravenosa, su biodisponibilidad es del 100 %. Sin embargo, cuando una

molécula o componente se administra por otras vías (como la oral), su biodisponibilidad disminuye (debido a la absorción incompleta y al metabolismo de primer paso). En un entorno nutricional, la biodisponibilidad se refiere a los índices de absorción y utilización de un nutriente. Las distintas formas de un mismo nutriente, por ejemplo, pueden tener diferentes biodisponibilidades.

5 Como se usa en este documento, el término "absorber" se refiere al proceso por el cual un material "asimila" o "recibe" otra sustancia. Por ejemplo, "absorción" se puede referir al proceso de absorción o asimilación de sustancias en las células o en los tejidos y órganos a través de la difusión u ósmosis (por ejemplo, la absorción de nutrientes por el sistema digestivo o la absorción de fármacos en el torrente sanguíneo).

10 Tal y como se usa en el presente documento, el término "adsorción" se refiere a un proceso que se produce cuando un material se fija y/o se acumula en la superficie de un sólido o un líquido (secuestrante y/o adsorbente) (por ejemplo, formando una película de moléculas o átomos (el adsorbato).

15 Tal como se usa en el presente documento, el término "digerir" se refiere a la conversión de alimentos, piensos u otros compuestos orgánicos en forma absorbible; para suavizar, descomponer o desintegrar por medio de calor y humedad o acción química.

20 Como se usa en el presente documento, "sistema digestivo" se refiere a un sistema (incluido el sistema gastrointestinal) en el que se puede producir o se produce la digestión.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término "piensos" se refiere a el/los material(es) que son consumidos por los animales y que aportan energía y/o nutrientes a la dieta de un animal. Entre los ejemplos de alimentos se incluyen, aunque no se limitan a, ración total mezclada (TMR), forraje(s), gránulo(s), concentrado(s), premezcla(s) coproducto(s), grano(s), grano(s) de destilación, melaza, fibra(s), pienso(s), hierba(s), heno, semilla(s), hojas, harina, soluble(s) y suplemento(s).

30 Como se usa en el presente documento, los términos "suplemento alimenticio", "suplemento dietético", "composición de suplemento dietético" y similares se refieren a un producto alimenticio formulado como un suplemento dietético o nutricional para utilizarlo como parte de una dieta, por ejemplo, como complemento al alimento para animales. En el presente documento, se describen las composiciones de suplementos dietéticos ejemplares.

35 Como se usa en el presente documento, el término "ácido graso omega-3" se refiere a ácidos grasos poliinsaturados que tienen el doble enlace final en la cadena de hidrocarburo entre el tercer y cuarto átomo de carbono del extremo metilo de la molécula. Los ejemplos no limitantes de ácidos grasos omega-3 incluyen, ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (EPA), ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico (DHA) y ácido 7,10,13,16,19 docosapentaenoico (DPA).

40 Como se usa en este documento, el término "animal" se refiere a los del reino animalia. Esto incluye, aunque no se limita a, ganado, animales de granja, animales domésticos, animales de compañía, animales marinos y de agua dulce y animales salvajes.

45 Como se usa en el presente documento, el término "tóxico" se refiere a cualesquiera efecto(s) perjudicial(es), nocivo(s), dañino(s) o de otra forma negativo(s) para un sujeto, una célula o un tejido en comparación con la misma célula o tejido antes del contacto o la administración de la toxina/tóxico.

50 Como se usa en el presente documento, el término "ácido" se refiere a cualquier compuesto químico que pueda dar protón(es) y/o recibir electrón(es). Entre los ácidos se incluyen, pero no se limitan a, clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, perclórico, fumárico, maleico, fosfórico, glicólico, láctico, salicílico, succínico, tolueno-p-sulfónico, tartárico, acético, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, fórmico, benzoico, malónico, sulfónico, naftaleno-2-sulfónico, bencenosulfónico y similares. Otros ácidos, tales como el oxálico, aunque no son en sí farmacéuticamente aceptables, pueden emplearse en la preparación de sales útiles como intermedios para obtener los compuestos de la invención y sus sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables.

55 Como se usa en este documento, el término "base" se refiere a cualquier compuesto químico que pueda recibir protón(es) y/o dar electrón(es) o iones de hidróxido. Las bases incluyen, pero no se limitan a, hidróxidos de metales alcalinos (por ejemplo, sodio), hidróxidos de metales alcalinotérreos (por ejemplo, magnesio), amoniaco y compuestos de fórmula NW_4^+ , donde W es C_{1-4} alquilo, y similares.

60 Como se usa en el presente documento, el término "sal" se refiere a compuestos que pueden obtenerse a partir de ácidos y bases inorgánicos u orgánicos. Entre los ejemplos de sales se incluyen, pero no se limitan a, acetato, adipato, alginato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, citrato, alcanfor, canforsulfonato, ciclopentilpropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, cloruro, bromuro, yoduro, 2-hidroxietanosulfonato, lactato, maleato, metanosulfonato, 2-naftaleno sulfato, nicotinato, oxalato, palmoato, pectinato, persulfato, fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, tosilato, undecanoato y similares. Otros ejemplos de sales

incluyen aniones de los compuestos de la presente invención compuestos por un catión adecuado, tal como Na^+NH_4^+ y NW_4^+ (donde W es un grupo alquilo C_{1-4}), y similares.

5 Como se usa en este documento, el término "agente antiespumante" se refiere a un aditivo usado para impedir la formación de espuma o se agrega para deshacer la espuma ya formada. Un "agente antiespumante" también conocido como "antiespumante" se refiere a un aditivo que reduce la tensión superficial de una solución o medio o emulsión o caldo en fermentadores debido a la ventilación o agitación, impidiendo o modificando así la formación de una espuma. Los agentes de uso común son aceites insolubles, dimetil polisiloxanos y otras siliconas, ciertos alcoholes como estearildecanol, octadecanol, sulfonatos, estearatos y glicoles.

10 Como se usa en el presente documento, el término "célula" se refiere a una unidad autorreplicante autónoma que puede existir como unidad de vida funcional e independiente (como en el caso de un organismo unicelular, por ejemplo, la levadura), o como una subunidad en un organismo multicelular (como en plantas y animales) que está especializada en llevar a cabo funciones particulares hacia la causa del organismo en su conjunto. Hay dos tipos distintos de células: células procariotas y células eucariotas.

15 Como se usa en el presente documento, el término "eucariota" se refiere a organismos cuyas células están organizadas en estructuras complejas albergadas dentro de membranas. Las "eucariotas" se distinguen de las "procariotas". El término "procariota" se refiere a los organismos que carecen de un núcleo celular u otros orgánulos unidos a la membrana. El término "eucariota" se refiere a todos los organismos con células que presentan las características típicas de los eucariotas, como la presencia de un verdadero núcleo limitado por una membrana nuclear, dentro de la cual se encuentran los cromosomas, la presencia de orgánulos unidos a la membrana y otras características observadas habitualmente en organismos eucariotas. Por lo tanto, el término incluye, aunque no se limita a organismos tales como hongos, protozoos y animales.

25 Como se usa en este documento, el término "concentración" se refiere a la cantidad de una sustancia por espacio definido. La concentración se expresa normalmente en términos de masa por unidad de volumen. Para diluir una solución, se debe agregar más disolvente o reducir la cantidad de soluto (por ejemplo, mediante evaporación selectiva, secado por pulverización, secado por congelación, por ejemplo, extracto concentrado de la pared celular de levadura o extracto concentrado de la pared celular de levadura modificada). Por el contrario, para concentrar una solución, se debe agregar más soluto o reducir la cantidad de disolvente.

30 Como se usa en el presente documento, el término "capa" se refiere a un depósito generalmente horizontal organizado en el estrato de un material que forma una parte o tramo suprayacente obtenido después de la separación por centrifugación en relación con las propiedades de densidad del material.

35 Como se usa en el presente documento, el término "extracción" se refiere al acto de recopilar o reunir materiales que se han producido (por ejemplo, reunir materiales producidos durante la producción de levadura).

40 Como se usa en el presente documento, el término "secado" se refiere al secado por pulverización, secado por congelación, secado al aire, secado al vacío o cualquier otro tipo de proceso que reduzca o elimine el líquido en una sustancia.

45 Como se usa en el presente documento, el término "secado por pulverización" se refiere a un método habitualmente utilizado para secar una sustancia que contiene un líquido usando gas caliente para evaporar el líquido y reducir o eliminar el líquido de la sustancia. Dicho de otra forma, el material se seca mediante pulverización o atomización en una corriente de aire seco calentado.

50 Como se usa en el presente documento, el término "secado por congelación" y el término "liofilización" y el término "criodesecación" se refieren a la eliminación de un disolvente de la materia en un estado congelado por sublimación. Esto se logra congelando el material que se va a secar por debajo de su punto eutéctico y luego proporcionando el calor latente de sublimación. El control preciso de la entrada de calor permite el secado desde el estado congelado sin que el producto se refunda. En la aplicación práctica, el proceso se acelera y se controla con precisión bajo condiciones de presión reducida.

55 Como se usa en el presente documento, el término "polvo seco que fluye libremente" se refiere a un polvo seco que fluye libremente, por ejemplo, a un polvo que se puede verter desde un recipiente, bolsa, envase, etc., sin obstaculizar grandes grupos.

60 Como se usa en este documento, el término "molienda" se refiere a reducir el tamaño de las partículas por impacto, cizallamiento o desgaste.

65 Como se usa en el presente documento, el término "lavado" se refiere a la eliminación o limpieza (por ejemplo, usando cualquier tipo de soluto (por ejemplo, agua destilada, tampón o disolvente) o mezcla) de impurezas o componentes solubles no deseados de una preparación (por ejemplo, un extracto de la pared celular de levadura se puede lavar para eliminar de la muestra los componentes de la pared celular que no son levadura).

- 5 Como se usa en el presente documento, el término "enzima" se refiere a una proteína o molécula basada en una proteína con una secuencia característica de aminoácidos que se pliega para producir una estructura tridimensional específica que otorga propiedades únicas a la molécula y que actúa como un catalizador o un químico para reacciones químicas específicas, convirtiendo un conjunto específico de reactivos (llamados sustratos) en productos específicos.
- 10 Como se usa en el presente documento, el término "péptido", el término "polipéptido" y el término "proteína" se refieren a una secuencia primaria de aminoácidos que se unen mediante "enlaces peptídicos" covalentes. En general, un péptido consiste en unos pocos aminoácidos, normalmente de 2 a 50 aminoácidos, y es más corto que una proteína. El término "polipéptido" abarca péptidos y proteínas. Los péptidos, polipéptidos o proteínas pueden ser sintéticos, recombinantes o producidos de forma natural. Un péptido sintético se produce por medios artificiales *in vitro* (por ejemplo, no se produce *in vivo*).
- 15 Como se usa en el presente documento, el término "proteasas" se refiere a cualquiera de varias enzimas, incluidas las endopeptidasas y exopeptidasas, que catalizan la descomposición hidrolítica de proteínas en péptidos o aminoácidos.
- 20 Como se usa en el presente documento, el término "lisis" se refiere a la desintegración o ruptura de la membrana celular de levadura y la pared celular de levadura que se produce en la liberación de los componentes intracelulares. Como se usa en el presente documento, la "lisis" se produce como resultado de mecanismos físicos, mecánicos, enzimáticos (incluida la autólisis e hidrólisis) u osmóticos (incluidos los "golpes de alcohol" y la hidrólisis).
- 25 Como se usa en el presente documento, el término "autólisis" se refiere a la descomposición de una parte o de una célula o tejido completo por agentes de producción propia, como por ejemplo, enzimas.
- 30 Como se usa en este documento, el término "hidrólisis" se refiere al proceso de dividir un compuesto en fragmentos con la adición de agua (por ejemplo, que se usa para descomponer polímeros en unidades más simples (por ejemplo, almidón en glucosa)).
- 35 Como se usa en este documento, el término "muestra" se usa en un sentido amplio que incluye una muestra o cultivo obtenido de cualquier fuente, así como muestras biológicas y ambientales. Las muestras biológicas se pueden obtener a partir de animales (incluidos los humanos) y engloban fluidos, sólidos, tejidos y gases. Las muestras biológicas incluyen productos sanguíneos, como plasma, suero y similares. Las muestras ambientales incluyen material ambiental, como materia superficial, tierra, agua, cristales y muestras industriales.
- 40 Tal como se usa en el presente documento, el término "complejo" se refiere a una entidad formada por asociación entre dos o más entidades separadas (por ejemplo, asociación entre dos o más entidades, en donde las entidades son iguales o diferentes (por ejemplo, especies químicas iguales o diferentes). La asociación puede ser a través de un enlace covalente o un enlace no covalente (por ejemplo, a través de Van der Waals, electrostático, interacción de carga, interacción hidrofóbica, interacción dipolo y/o fuerzas de enlace de hidrógeno (por ejemplo, uniones de uretano, uniones de amida, uniones de éster y su combinación)).
- 45 Como se usa en el presente documento, el término "antioxidante" se refiere a una molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas.
- 50 Como se usa en este documento, el término "vitamina E" también se refiere como "VE" al nombre colectivo de un conjunto de 8 tocoferoles relacionados con α , β , γ y δ y los cuatro tocotrienoles correspondientes, que son vitaminas solubles en grasas con propiedades antioxidantes.
- 55 Como se usa en el presente documento, el término "vitamina C" se refiere a un nutriente esencial para los seres humanos, un gran número de especies de primates superiores, un pequeño número de otras especies de mamíferos (en particular, cobayas y murciélagos), algunas especies de aves y algunos peces.
- Como se usa en este documento, el término "ascorbato" se refiere a (un ion de ácido ascórbico) se requiere para un rango de reacciones metabólicas esenciales en todos los animales y plantas.
- Como se usa en el presente documento, el término "agente conservante" y el término "conservante" se refieren a mantener intacto, libre de descomposición y a preservar o proteger de la descomposición.
- 60 Tal como se utiliza aquí, el término "ganado", también hace referencia a "especies de ganado" y también hace referencia a "ganado doméstico" y a "animales de cría intensiva". Se refiere a un animal domesticado criado intencionalmente en un entorno agrícola o de acuicultura para producir artículos tales como alimentos o fibra, o por su trabajo.
- 65 Como se usa en el presente documento, el término "CAT" se refiere a la capacidad antioxidante total. CAT se puede referir al espectro de actividad antioxidante contra varios radicales reactivos de oxígeno/nitrógeno. Se pueden utilizar

varios tipos diferentes de ensayos para determinar la CAT, incluidos los ensayos de capacidad antioxidante total de Brunswick (por ejemplo, centrados en los antioxidantes no enzimáticos contra el radical peroxilo (ROO), radical hidroxilo (HO), oxígeno singlete (1O2) y peroxinitrito (ONOO-).

5 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere a un método para analizar alimentos para animales. En particular, se describen sistemas y métodos *in vitro* para analizar el alimento para animales con respecto al metabolismo de los nutrientes y fuentes de energía.

10 Los métodos actuales para analizar el alimento para animales con respecto a los nutrientes y fuentes de energía conllevan procedimientos que requieren hasta dos semanas de trabajo preparatorio y el uso de varias piezas de equipo distintas. Algunos métodos conllevan el análisis *in vivo* de las características de la digestión mediante espectroscopia de infrarrojo cercano. Los modelos desarrollados utilizando tales métodos solo proporcionan un factor pronóstico de un alimento inicial, que no incluye los efectos que ciertas enzimas pueden tener en la mejora de la digestión. Estas soluciones no utilizan un procedimiento animal *in vitro* ni imitan continuamente la digestión. La mayoría de las técnicas solo son aplicables a un alimento específico. No hay un procedimiento en el momento actual que pueda dar resultados para una multitud de alimentos y enzimas de una manera eficiente.

15 Por consiguiente, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona una manera eficiente de analizar los alimentos (por ejemplo, alimento para animales) para determinar los efectos enzimáticos en la energía bruta, energía digestible, liberación de fósforo, liberación de azúcar, y para determinar si hay presente en la comida una enzima aditiva. Estos sistemas y métodos descritos en este documento pueden analizar múltiples componentes de una gran cantidad de alimentos y pueden actualizarse rápidamente sin llevar a cabo ensayos *in vivo*.

20 Las realizaciones de la presente invención se describen en la figura 1 y el ejemplo 1 de a continuación. El ejemplo 1 describe el desarrollo de una base de datos y/o modelo que identifica y caracteriza (por ejemplo, cuantifica) datos espectrales. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los métodos utilizan digestión *in vitro*, seguida de un análisis con un dispositivo de espectroscopia de infrarrojo cercano y un análisis analítico. En algunas realizaciones, el análisis analítico identifica la proteína residual, el fósforo, los hidratos de carbono y la energía bruta que quedan después de la digestión *in vitro*. En algunas realizaciones, se utiliza un calorímetro de bomba para analizar la energía bruta, un analizador de combustión de nitrógeno para la proteína y el detector de minerales (por ejemplo, plasma de acoplamiento inductivo (ICP)) para el contenido de fósforo. La NIR se utiliza para escanear el material digerido. Los resultados analíticos de una pluralidad de muestras (por ejemplo, 5 o más, 10 o más, 20 o más, 50 o más, etc.) se utilizan para correlacionar las máximas de NIR con un componente particular del alimento digerido. Después, un modelo que permite la identificación y el análisis de espectros de NIR se genera a partir de la correlación. Este modelo o base de datos se utiliza después para identificar y cuantificar las máximas sin la necesidad de realizar un análisis analítico completo de cada muestra.

40 **I. Análisis del alimento**

Por lo tanto, en algunas realizaciones, los sistemas y métodos de la presente divulgación realizan las siguientes etapas: a) el alimento se digiere usando un modelo *in vitro*; b) la materia seca recogida se analiza mediante espectroscopia (por ejemplo, NIR); y c) la base de datos/modelo descrito se utiliza para identificar y cuantificar las máximas espectrales. Los sistemas y métodos descritos en el presente documento permiten un análisis rápido y preciso del alimento para animales sin un análisis analítico extenso. En algunas realizaciones, los resultados se usan para predecir el impacto de una enzima en particular (por ejemplo, una enzima digestiva) en cuanto a la digestibilidad de una formulación de alimento determinada.

50 La digestión *in vitro* se utiliza para imitar lo máximo posible la digestión animal que se produce de forma natural dentro de un animal, al mismo tiempo que proporciona resultados consecuentes en condiciones controladas por el laboratorio. El procedimiento de digestión es importante conseguir completamente los efectos del componente analizado (por ejemplo, de la enzima). En algunas realizaciones, la digestión *in vitro* incluye una etapa de digestión gástrica y una etapa posterior de digestión intestinal. En algunas realizaciones, la pepsina se incluye en la etapa de digestión gástrica y la pancreatina se incluye en la etapa de digestión intestinal. La presente invención no se limita a una cronología, pH o enzima de digestión en particular. El protocolo puede modificarse según el alimento y los niveles de digestión deseados. Los métodos de digestión *in vitro* ejemplares se describen en las patentes estadounidenses 6.750.035, 8.357.408 y 8.067.238 y Boisen, S. (1990). A Model for Feed Evaluation Based on *In vitro* Digestible Dry Matter and Protein. En: *In vitro Digestion for Pigs and Poultry* (M.F. Fuller, editor). Oxford University Press, Oxford, págs. 136-139.

65 En algunas realizaciones, la espectroscopia de infrarrojo cercano se usa para analizar el alimento digerido. El dispositivo de espectroscopia de infrarrojo cercano escanea el alimento digerido en busca de componentes ubicados dentro del alimento digerido y proporciona un número cuantitativo. Esto permite una proyección precisa de los efectos de una enzima dentro de un animal.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, los sistemas y métodos descritos en el presente documento se usan para

determinar si un aditivo de alimento en particular ayuda o inhibe la digestión del alimento en un animal. Esta información es útil para determinar las formulaciones de los alimentos para maximizar la biodisponibilidad de los alimentos.

5 Los sistemas y métodos descritos aquí se pueden usar para más de un alimento específico y también pueden observar los efectos de múltiples enzimas a nivel digestivo. Estos resultados se obtienen de una manera rápida que proporciona información a los usuarios (por ejemplo, agricultores) relacionados con un entorno del mundo real.

10 Los sistemas y métodos descritos en el presente documento son adecuados para analizar los alimentos para una variedad de enzimas. Los componentes dentro de un alimento complejo pueden modificarse y pueden provenir de varias fuentes.

II. Alimento

15 La presente divulgación se usa en el análisis de cualquier número de alimentos para animales y no se limita al análisis de un alimento en particular. El alimento para animales es cualquier alimento que se utiliza específicamente para alimentar ganado doméstico (por ejemplo, ganado vacuno, cabras, ovejas, caballos, aves, búfalos, alpacas, llamas, burros, mulas, conejos y cerdos). Los alimentos para animales a menudo incluyen heno, paja, ensilaje, alimentos comprimidos y granulados, aceites y raciones mixtas, enzimas y también granos germinados y legumbres.

20 La industria mundial de alimentos para animales consumió 635 millones de toneladas de alimentos en 2006, con un índice de crecimiento anual de alrededor del 2 %. El uso de tierras agrícolas para cultivar alimentos en lugar de alimentos para humanos puede ser controvertido; algunos tipos de alimento, como el maíz, también pueden servir como alimento humano, mientras que otros como la hierba no pueden.

25 Además de proporcionar una fuente de energía a los animales, los alimentos para animales también proporcionan nutrientes utilizados por el cuerpo para protegerlos del estrés oxidativo. Por ejemplo, el alimento para animales a menudo incluye antioxidantes que son importantes para optimizar la inmunidad, la salud y la producción. Los animales que poseen un fuerte potencial antioxidante (por ejemplo, a través del consumo de una dieta rica en antioxidantes) dan como resultado animales que están mejor dotados para soportar el estrés y el rendimiento a su máximo potencial.

30 En algunas realizaciones, el alimento incluye selenio. La presente invención no está limitada por el tipo o fuente de componente de selenio. De hecho, en la invención se utiliza una variedad de diferentes tipos y fuentes de selenio, incluyendo pero no limitándose a fuentes orgánicas de selenio (por ejemplo, levadura selenizada, selenometionina, etc.) así como fuentes inorgánicas de selenio (por ejemplo, sal de selenio (por ejemplo, selenito de sodio, selenato de sodio, selenito de cobalto y selenato de cobalto, ácido selénico, ácido selénico, bromuro de selenio, cloruro de selenio, hexafluoruro de selenio, óxido de selenio, oxibromuro de selenio, oxiclorigenato de selenio, oxifluoruro de selenio, sulfuro de selenio, tetrabromuro de selenio, tetracloruro de selenio, tetrafluoruro de selenio, etc.). En una realización preferida, el componente de selenio es SEL-PLEX (Alltech, Nicholasville, Kentucky).

35 En algunas realizaciones, los alimentos para animales incluyen ácidos grasos omega-3. La presente invención no se limita a ningún ácido graso omega-3 en particular. De hecho, una variedad de ácidos grasos omega-3 se utiliza en una composición de suplemento dietético de la invención que incluye, pero no se limita a, ácido α -linolénico (ALA), ácido estearidónico (STD), ácido eicosatrienoico (ETE), ácido eicosatetraenoico (ETA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosapentaenoico (DPA), ácido docosahexaenoico (DHA), ácido tetracosapentaenoico y ácido tetracosahexaenoico (ácido nisínico). En una realización preferida, el ácido graso omega-3 es DHA. De manera similar, la presente invención no se limita a ninguna fuente particular de ácido graso omega-3. De hecho, se puede utilizar una variedad de fuentes de ácidos grasos omega-3 que incluyen, entre otras, algas (por ejemplo, de harina de algas), aceite de krill u otra fuente conocida por poseer ácidos grasos omega-3. En algunas realizaciones, el ácido graso omega-3 se produce de forma natural (por ejemplo, en una célula vegetal o animal). En algunas realizaciones, el ácido graso omega-3 se genera de forma sintética.

40 En algunas realizaciones, los alimentos para animales comprenden harina de algas. En algunas realizaciones, la harina de algas se crea utilizando organismos que producen altos niveles de ácidos grasos. En algunas realizaciones, la harina de algas se crea utilizando una especie con alta producción de ácido docosahexaenoico (DHA). En algunas realizaciones, la especie de algas está dentro de los labirintulomicetes (traustochytridios, labirintúlidos). En algunas realizaciones, la especie de algas se selecciona de, por ejemplo, uno o más de los siguientes: *Thraustochytrium* sp. *Thraustochytrium striatum*, *Thraustochytrium roseum*, *Thraustochytrium aureum*, *Schizochytrium limacinum*, *Cryptocodinium cohnii*, y *Aurantiochytrium* sp.

45 En algunas realizaciones, los alimentos para animales incluyen antioxidantes. En algunas realizaciones, los antioxidantes son ácido ascórbico. La presente invención no se limita a ninguna fuente o tipo particular de ácido ascórbico (por ejemplo, un ácido de azúcar con propiedades antioxidantes). En algunas realizaciones, el ácido ascórbico es vitamina C. En algunas realizaciones, se utiliza un ascorbato (por ejemplo, ácido ascórbico, sales de ascorbato mineral, rosa mosqueta, acerola y similares).

50 En el caso de un alimento para animales proporcionado a animales, de acuerdo con la presente invención se puede

utilizar cualquier mezcla de alimentos para animales conocida en la técnica, tal como harina de colza, harina de semilla de algodón, harina de soja y harina de maíz, pero se prefieren, en particular, la harina de soja y la harina de maíz. La mezcla de alimento para animales se complementa con una composición de suplemento dietético de la invención, pero opcionalmente se pueden agregar otros ingredientes a la mezcla de alimento para animales. Los ingredientes opcionales de la mezcla de alimento para animales incluyen azúcares e hidratos de carbono complejos, tales como monosacáridos, disacáridos y polisacáridos solubles en agua e insolubles en agua. Los ingredientes de aminoácidos opcionales que se pueden agregar a la mezcla de alimento son arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, valina, etiltirosina HCl, alanina, ácido aspártico, glutamato de sodio, glicina, prolina, serina, etilcisteína HCl y análogos y sus sales. Las vitaminas que pueden agregarse opcionalmente son tiamina HCl, riboflavina, piridoxina HCl, niacina, niacinamida, inositol, cloruro de colina, pantotenato de calcio, biotina, ácido fólico y vitaminas A, B, K, D, E y similares. También se pueden añadir minerales, ingredientes proteicos, incluida la proteína obtenida de la harina de carne o harina de pescado, huevo líquido o en polvo, solubles de pescado, concentrado de proteína de suero, aceites (por ejemplo, aceite de soja), almidón de maíz, calcio, fosfato inorgánico, sulfato de cobre, sal y piedra caliza. Cualquier ingrediente de medicamento conocido en la técnica se puede agregar a la mezcla de alimento para animales, como los antibióticos.

En algunas realizaciones, un alimento para animales comprende uno o más de los siguientes: alfalfa (mielga), cebada, loto corniculado, Brassica (por ejemplo, Chau moellier, col rizada, colza (canola), rutabaga (colinabo) (nabo), trébol (por ejemplo, trébol Alsike, trébol rojo, trébol subterráneo, trébol blanco), hierba (por ejemplo, hierba de avena falsa, festuca, grama común, bromo, triguillo del agua. Gramíneas pratenses (prados de pastos naturalmente mezclados), avallico, *Lolium*, fleo), maíz, mijo, avenas, maicillo, granos de soja, árboles (ramas de árboles podados del "árbol de heno") y trigo.

Las composiciones de la invención pueden comprender uno o más ingredientes inertes (por ejemplo, si es deseable limitar el número de calorías agregadas a la dieta por el suplemento dietético) cuando se alimenta a los animales. Por ejemplo, las composiciones de suplementos dietéticos y/o alimentos para animales o productos alimenticios a los que se agrega la composición de suplementos dietéticos de la invención también pueden contener ingredientes opcionales que incluyen, por ejemplo, especias, vitaminas, minerales, potenciadores, colorantes, edulcorantes, saborizantes, ingredientes inertes, dehidroepiandrosterona (DHEA), Fo-Ti o Ho Shu Wu (hierba común a los tratamientos asiáticos tradicionales), uña de gato (ingrediente herbario antiguo), té verde (polifenoles), inositol, algas marinas, dulce, bioflavonoides, maltodextrina, ortigas, niacina, niacinamida, romero, selenio, sílice (dióxido de silicio, gel de sílice, cola de caballo, equiseto de invierno y similares), espirulina, zinc y similares. Tales ingredientes opcionales pueden ser formas naturales o concentradas.

En algunas realizaciones, una composición de suplemento dietético de la invención se mezcla con y/o se combina con otros productos alimenticios (por ejemplo, para producir un alimento para animales) que incluye, pero no se limita a, fosfato o acetato de calcio tribásico; fosfato de potasio dibásico; sulfato u óxido de magnesio; sal (cloruro de sodio); cloruro o acetato de potasio; ortofosfato férrico; niacinamida; sulfato u óxido de zinc; pantotenato de calcio; gluconato de cobre; riboflavina; betacaroteno; clorhidrato de piridoxina; mononitrato de tiamina; ácido fólico; biotina; cloruro de cromo o picolonato; yoduro de potasio; selenato de sodio; molibdato de sodio; filoquinona; vitamina D3; cianocobalamina; selenito de sodio; sulfato de cobre; vitamina A; inositol; yoduro de potasio. Las dosis adecuadas de vitaminas y minerales se pueden obtener, por ejemplo, consultando las normas de CDR de EE. UU.

En realizaciones adicionales, una composición de suplemento dietético de la invención u otro producto alimenticio al que se añade una composición de suplemento dietético y/o se combina con (por ejemplo, para producir un alimento para animales) puede incluir uno o más aromatizantes alimentarios, tales como acetaldehído (etanal), acetoina (acetil metilcarbinol), anetol (parapropenil anisol), benzaldehído (aldehído benzoico), ácido butírico N (ácido butanoico), d o 1 carvona (carvol), cinamaldehído (aldehído cinámico), citral (2,6 dimetiloctadieno 2,6 al 8, geranial, neral), decanal (N decilaldehído, capraldehído, aldehído cáprico, caprinaldehído, aldehído C 10), acetato de etilo, butirato de etilo, éster etílico del ácido 3-metil-3-fenilglicídico (etil fenil glicidato, aldehído de fresa, aldehído C16), etil vainillina, geraniol (3,7 dimetil 2,6 y 3,6-octadien-1-ol), acetato de geraniol (acetato de geraniol), limoneno (d, 1 y dl), linalool (linalol, 3,7 dimetilo 1,6-octadien-3-ol), acetato de linalilo (bergamol), antranilato de metilo (metil 2 aminobenzoato), piperonal (3,4 metilendioxi benzaldehído, heliotropina), vainillina, alfalfa (*Medicago sativa* L.), pimienta de Jamaica (*Pimenta officinalis*), semillas de ambrette (*Hibiscus abelmoschus*), angelica (Angélica archangelica), angostura (*Galipea officinalis*), anís (*Pimpinella anisum*), anís estrellado (*Illicium verum*), bálsamo (*Melissa officinalis*), albahaca (*Ocimum basilicum*), laurel (*Laurus nobilis*), caléndula (*Caléndula officinalis*), (*Anthemis nobilis*), cayena (*Capsicum frutescens*), alcaravea (*Laurus carvi*), cardamomo (*Elettaria cardamomum*), casia (*Cinnamomum Cassia*), pimienta de cayena (*Capsicum frutescens*), semilla de apio (*Apium graveolens*), perifollo (*Anthriscus cerefolium*), cebollinos (*Allium schoenoprasum*), cilantro (*Coriandrum sativum*), comino (*Cuminum cyminum*), flores de saúco (*Sambucus canadensis*), hinojo (*Foeniculum vulgare*), fenogreco (*Trigonella foenum graecum*), jengibre (*Zingiber officinale*), marrubio (*Marrubium vulgare*), rábano picante (*A Armoracia lapathifolia*), hisopo (*Hyssopus officinalis*), lavanda (*Lavandula officinalis*), macis (*Myristica fragrans*), mejorana (*Majorana hortensis*), mostaza (*Brassica nigra*, *Brassica juncea*, *Brassica hirta*), nuez moscada (*Myristica fragrans*), pimentón (*Capsicum annuum*), cayena negra (*Piper nigrum*), menta (*Mentha piperita*), semilla de amapola (*Papaver somniferum*), romero (*Rosmarinus officinalis*), azafrán (*Crocus sativus*), salvia (*Salvia officinalis*), ajedrea (*Satureia hortensis*, *Satureia montana*), ajonjolí (*Sesamum indicum*), menta verde (*Mentha spicata*), estragón (*Artemisia*

dracunculus), tomillo (*Thymus vulgaris*, *Thymus serpyllum*), cúrcuma (*Curcuma longa*), vainilla (*Vanilla planifolia*), zedoaria (*Curcuma zedoaria*), sacarosa, glucosa, sacarina, sorbitol, manitol, aspartamo. Otros aromas adecuados se describen en referencias como *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª edición, Mack Publishing, págs. 1288-1300 (1990) y Furia y Pellanca, *Handbook of Flavour Ingredients de Fenaroli*, The Chemical Rubber Company, Cleveland, Ohio, (1971), conocidos por los expertos en la materia.

En otras realizaciones, las composiciones comprenden al menos un colorante alimentario sintético o natural (por ejemplo, extracto de achiote, astaxantina, remolacha en polvo, azul ultramar, cantaxantina, caramelo, carotenal, betacaroteno, carmín, harina de algodón tostada, gluconato ferroso, lactato ferroso, extracto de color de uva, extracto de piel de uva, óxido de hierro, jugo de frutas, jugo de vegetales, secados, harina de tagetes, aceite de zanahoria, aceite de endosperma de maíz, pimentón, oleoresina de pimentón, riboflavina, azafrán, cúrcuma, cúrcuma y oleoresina).

En otras realizaciones adicionales, las composiciones comprenden al menos un fitonutriente (por ejemplo, isoflavonoides de soja, proantocianidinas oligoméricas, indol-3-carbinol, sulforafano, ligandos fibrosos, fitoesteroles vegetales, ácido ferúlico, antocianocidas, triterpenos, ácidos grasos omega 3/6, ácidos grasos conjugados, tales como ácido linoleico conjugado y ácido linoléico conjugado, poliacetileno, quinonas, terpenos, catequinas, galatos y quercetina). Las fuentes de fitonutrientes de las plantas incluyen, pero no se limitan a, lecitina de soja, isoflavonas de soja, germen de arroz integral, jalea real, propóleo de abeja, polvo de jugo de baya de acerola, té verde japonés, extracto de semilla de uva, extracto de piel de uva, jugo de zanahoria, arándano, harina de linaza, polen de abeja, ginkgo biloba, onagra (aceite de primula de tarde), trébol rojo, raíz de bardana, diente de león, perejil, rosa mosqueta, cardo de leche, jengibre, ginseng siberiano, romero, curcumina, ajo, licopeno, extracto de semilla de pomelo, espinaca y brócoli.

En otras realizaciones más, las composiciones comprenden al menos una vitamina (por ejemplo, vitamina A, tiamina (B1), riboflavina (B2), piridoxina (B6), cianocobalamina (B12), biotina, ácido retinoico (vitamina D), vitamina E, ácido fólico y otros folatos, vitamina K, niacina y ácido pantoténico). En algunas realizaciones, las partículas comprenden al menos un mineral (por ejemplo, sodio, potasio, magnesio, calcio, fósforo, cloro, hierro, zinc, manganeso, flúor, cobre, molibdeno, cromo y yodo). En algunas realizaciones particularmente preferidas, una dosis de una pluralidad de partículas incluye vitaminas o minerales en el rango de la cantidad diaria recomendada (CDR) según lo especificado por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. En otras realizaciones más, las partículas comprenden una fórmula de suplemento de aminoácido en la que se incluye al menos un aminoácido (por ejemplo, 1-carnitina o triptófano).

En una realización, la muestra de alimento para animales comprende un aditivo y, en una realización, el aditivo comprende una enzima.

En algunas realizaciones, las composiciones alimenticias contienen enzimas suplementarias. Las enzimas optimizan la disponibilidad de los nutrientes de los piensos de origen vegetal. Los animales monogástricos, por ejemplo, los cerdos o las aves de corral no tienen sus propias enzimas para utilizar sustancias específicas, como los polisacáridos no amiláceos (NSP) y los fitatos. Por lo tanto, parte del alimento normalmente queda sin digerir. Dichos componentes no digeridos pasan a través del tubo digestivo, lo que significa que el animal pierde algo de valor nutricional del alimento, además de que existe una carga adicional para el medio ambiente, especialmente en áreas densamente cultivadas. Agregar enzimas alimenticias a la dieta resuelve este problema y aumenta la eficacia de la utilización de nutrientes. Ejemplos de tales enzimas son proteasas, proteasas fúngicas, celulasas, xilanasas, fitasa, fosfatasa ácida, beta-glucanasa, pectinasa y alfa-amilasa. Las enzimas pueden proporcionarse en forma purificada, forma parcialmente purificada o forma cruda. Las fuentes de enzimas pueden ser naturales (por ejemplo, fúngicas) o sintéticas o producidas *in vitro* (por ejemplo, recombinante). En algunas realizaciones, se agrega una proteasa (por ejemplo, pepsina). En algunas realizaciones, se agregan enzimas o mezclas de enzimas disponibles en el mercado (por ejemplo, Allzyme SSF, disponible en Alltech, Nicholasville, Kentucky).

En algunas realizaciones, también pueden añadirse antioxidantes a los productos alimenticios, tales como una composición de alimento para animales. La oxidación se puede impedir gracias a la introducción de antioxidantes naturales, como el betacaroteno, la vitamina C y/o de antioxidantes sintéticos como el hidroxitolueno butilado, el hidroxianisol butilado, la butilhidroquinona terciaria, el galato de propilo o la etoxiquina en el producto alimenticio. También se pueden agregar compuestos que actúan sinérgicamente con antioxidantes, como el ácido ascórbico, el ácido cítrico y el ácido fosfórico. La cantidad de antioxidantes incorporados de esta manera depende de requisitos tales como la formulación del producto, las condiciones de envío, los métodos de embalado y la vida útil deseada.

Las composiciones de la invención pueden proporcionarse a cualquier animal. Los animales de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, especies aviares, bovinos, porcinos, equinos, ovinos y caprinos, acuáticos, mariscos, camélidos, felinos, caninos y roedores. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un producto alimenticio que comprende una composición de suplemento dietético de la invención se proporciona a cualquier animal monogástrico (es decir, un animal que tiene un estómago con un solo compartimento) que incluye, pero no se limita a, animales agrícolas, como especies porcinas (por ejemplo, cerdos machos castrados, primerizas (es decir, hembras antes del primer apareamiento) y cualquier otro tipo de porcino), pollos (por ejemplo, de cualquier tipo,

clase o especie, incluidos, entre otros, pollos de engorde y criadores), pavos (pollitos (es decir, primeras semanas después de la eclosión) y animales mayores), patos, faisanes, gansos, codornices, vacas, ovejas, cabras, roedores de laboratorio (ratas, ratones, hámsteres y jerbos), animales de pelo como el visón y el zorro, y animales de zoológico, tales como monos y simios, cualquier otra especie aviar, especies acuáticas marinas o de agua dulce, animales en cautividad (por ejemplo, animales de zoológico) o animales domésticos (por ejemplo, caninos y felinos).

III. Sistemas

Los sistemas para el análisis de alimentos para animales comprenden componentes útiles, necesarios o suficientes para realizar la digestión *in vitro*, obtención de datos espectrales y análisis de los datos espectrales para determinar el impacto de los aditivos alimentarios en la digestión del alimento para animales.

Por ejemplo, los sistemas comprenden reactivos y recipientes para realizar la digestión *in vitro* (por ejemplo, enzimas, ácido, componentes de control de temperatura, recipientes de reacción, etc.). En algunos casos, los sistemas comprenden instrumentos NIR y consumibles. En algunos casos, los sistemas comprenden sistemas informáticos y *software* informático para analizar los datos espectrales.

Son posibles una variedad de implementaciones relacionadas con el ordenador, como la programación informática para analizar y comparar un patrón de máximas NIR a, por ejemplo, una biblioteca de máximas, que se sabe que representan un análisis particular (por ejemplo, utilizando los métodos descritos en este documento).

Los métodos y sistemas descritos en este documento pueden implementarse de numerosas maneras.

Los métodos conllevan el uso de una infraestructura de comunicaciones, por ejemplo, internet. A continuación, se comentan varios ejemplos de la invención. También debe entenderse que la presente invención puede implementarse en diversas formas de *hardware*, *software*, *firmware*, procesadores, servidores distribuidos (por ejemplo, como se usa en la nube informática) o una combinación de los mismos. Los métodos y sistemas descritos en el presente documento pueden implementarse como una combinación de *hardware* y *software*. El *software* puede implementarse como un programa de aplicación incorporado de forma tangible en un dispositivo de almacenamiento de programas o en diferentes partes del *software* implementado en el entorno informático del usuario (por ejemplo, como un *miniaplicación*) y en el entorno informático del revisor, donde el revisor puede ubicarse en un sitio remoto (por ejemplo, en las instalaciones de un proveedor de servicios).

Por ejemplo, durante o después de la entrada de datos por parte del usuario, ciertas partes del procesamiento de datos pueden realizarse en el entorno informático del lado del usuario. Por ejemplo, el entorno informático del lado del usuario puede programarse para proporcionar códigos de prueba definidos para indicar la plataforma, la prueba de diagnóstico/soporte, o ambos; el procesamiento de datos mediante indicadores definidos y/o la generación de configuraciones de indicadores, donde las respuestas se transmiten como respuestas procesadas o parcialmente procesadas hacia el entorno informático del revisor en forma de código de prueba y configuraciones de indicadores para la ejecución posterior de uno o más algoritmos para proporcionar un resultado y/o generar un informe en el entorno informático del revisor.

El programa de aplicación para ejecutar los algoritmos descritos en este documento puede ser cargado y ejecutado por una máquina que comprenda cualquier estructura adecuada. En general, la máquina integra una plataforma informática con *hardware*, como una o más unidades de procesamiento central (CPU), una memoria de acceso aleatorio (RAM) e interfaz(es) de entrada/salida (E/S). La plataforma informática también incluye un sistema operativo y un código de microinstrucción. Los diversos procesos y funciones descritos en el presente documento pueden ser parte del código de microinstrucción o parte del programa de aplicación (o una combinación de los mismos) que se ejecuta a través del sistema operativo. Además, se pueden conectar otros dispositivos periféricos a la plataforma informática, como un dispositivo de almacenamiento de datos adicional y un dispositivo de impresión.

Como sistema informático, el sistema incluye, por lo general, una unidad de procesador. La unidad procesadora funciona para recibir información que, por lo general, incluye datos de prueba (por ejemplo, espectros NIR), y una base de datos de datos conocidos (por ejemplo, información de máximas determinada experimentalmente a partir de una pluralidad de muestras). Esta información recibida se puede almacenar al menos temporalmente en una base de datos, y los datos analizados.

Parte o todos los datos de entrada y salida también pueden enviarse electrónicamente; ciertos datos de salida (por ejemplo, informes) pueden enviarse de forma electrónica o telefónica (por ejemplo, por fax, por ejemplo, utilizando dispositivos como un fax). Los dispositivos de recepción de salida ejemplares pueden incluir un elemento de visualización, una impresora, un dispositivo de fax y similares. Las formas electrónicas de transmisión y/o visualización pueden incluir correo electrónico, televisión interactiva y similares. En algunas realizaciones, todos o una parte de los datos de entrada y/o todos o una parte de los datos de salida (por ejemplo, la identificación y cuantificación de máximas) se mantienen en un servidor para acceder a ellos, por ejemplo, mediante acceso confidencial. Se puede acceder o enviar los resultados a profesionales tal y como se desee.

Un sistema para su uso en los métodos descritos en este documento incluye, por lo general, al menos un procesador

informático (por ejemplo, cuando el método se lleva a cabo en su totalidad en un solo sitio) o al menos dos procesadores informáticos en red (por ejemplo, donde un usuario debe ingresar datos espectrales) y transmitido a un sitio remoto hasta un segundo procesador informático para su análisis (por ejemplo, identificación y caracterización de máximas), donde el primer y el segundo procesadores informáticos están conectados por una red, por ejemplo, a través de una intranet o internet. El sistema también puede incluir componente(s) de usuario para introducirlos; y componente(s) de revisión para la revisión de datos y generación de informes. Los componentes adicionales del sistema pueden incluir uno o más componentes del servidor; y una(s) base(s) de datos para almacenar datos (por ejemplo, como en una base de datos de elementos de informe, o una base de datos relacional (RBD) que puede incluir la entrada de datos por parte del usuario y la salida de datos). Los procesadores de computadora pueden ser procesadores que se encuentren normalmente en ordenadores de escritorio personales (por ejemplo, IBM, Dell, Macintosh), ordenadores portátiles, ordenadores principales, miniordenadores, dispositivos electrónicos portátiles (por ejemplo, tabletas o teléfonos inteligentes) u otros dispositivos informáticos.

Los componentes de entrada pueden ser ordenadores personales completos e independientes que ofrecen una gama completa de acciones y funciones para ejecutar aplicaciones. El componente de usuario generalmente opera bajo cualquier sistema operativo deseado e incluye un elemento de comunicación (por ejemplo, un módem u otro *hardware* para conectarse a una red), uno o más dispositivos de entrada (por ejemplo, un teclado, ratón, teclado numérico u otro dispositivo usado para transferir información o comandos), un elemento de almacenamiento (por ejemplo, un disco duro u otro medio de almacenamiento de escritura informática, legible por ordenador), y un elemento de pantalla (por ejemplo, un monitor, televisor, LCD, LED u otro dispositivo de pantalla que transmita información al usuario). El usuario ingresa los comandos de entrada en el procesador informático a través de un dispositivo de entrada. En general, la interfaz de usuario es una interfaz gráfica de usuario (GUI) escrita para aplicaciones de navegador web.

El/los componente(s) del servidor puede(n) ser un ordenador personal, un miniordenador o un ordenador principal, o pueden distribuirse por múltiples servidores (por ejemplo, como en aplicaciones informáticas en la nube) y ofrecen administración de datos, intercambio de información entre clientes, administración de redes y seguridad. La aplicación y cualquier base de datos utilizadas pueden estar en el mismo servidor o en servidores diferentes. Se contemplan otras disposiciones informáticas para el usuario y el/los servidor(es), incluido el procesamiento en una sola máquina, como un ordenador principal, un grupo de máquinas u otra configuración adecuada. En general, las máquinas de usuario y servidor trabajan juntas para llevar a cabo el procesamiento de la presente invención.

Cuando se usan, la(s) base(s) de datos suele(n) estar conectada(s) al componente del servidor de la base de datos y pueden ser cualquier dispositivo que contenga datos. Por ejemplo, la base de datos puede ser cualquier dispositivo de almacenamiento magnético u óptico para un ordenador (por ejemplo, CDROM, disco duro interno, unidad de cinta). La base de datos puede ubicarse de forma remota al componente del servidor (con acceso a través de una red, módem, etc.) o localmente al componente del servidor.

Cuando se utiliza en el sistema y en los métodos, la base de datos puede ser una base de datos relacional que se organiza y a la que se accede de acuerdo con las relaciones entre los elementos de datos. La base de datos relacional está compuesta, por lo general, de una pluralidad de tablas (entidades). Las filas de una tabla representan registros (recopilaciones de información sobre elementos separados) y las columnas representan campos (atributos particulares de un registro). En su concepción más simple, la base de datos relacional es un grupo de entradas de datos que se "relacionan" entre sí a través de al menos un campo común.

Se pueden usar estaciones de trabajo adicionales equipadas con ordenadores e impresoras en el punto de servicio para ingresar datos y, en algunas realizaciones, generar informes apropiados, si se desea. El/los ordenador(es) puede(n) tener un acceso directo (por ejemplo, en el escritorio) para iniciar la aplicación y así facilitar el inicio de la entrada de datos, la transmisión, el análisis, la recepción de informes, etc., según se desee.

EXPERIMENTACIÓN

Los siguientes ejemplos se proporcionan para demostrar e ilustrar adicionalmente ciertas realizaciones preferidas y aspectos de la presente invención y no deben interpretarse como limitantes de su alcance.

Ejemplo 1

Digestión *in vitro*

60 Modelo porcino *In vitro* para la liberación de fosfato y azúcar

Referencia: Boisen S., A multienzyme assay for pigs, Capítulo 10, *A Model for Feed Evaluation Based on In vitro Digestible Dry Matter and Protein, In vitro Digestion for Pig and Poultry*, 1990, M.F. Fuller

65

Reactivos:

- 5 A. 0,2 M HCl
 B. 4 M HCl
 C. 2 M HCl
- 10 D. 0,6 M NaOH: disolver 24 g de hidróxido de sodio (Fisher S318) en 900 ml de agua desionizada y conseguir un volumen final de 1 l.
 E. Pepsina de Sigma (P7012): almacenar a -20 °C
 F. Pancreatina de Sigma (P3292): almacenar a -20 °C
 G. Ácido tricloroacético (TCA) al 15 %: diluir 15 g de ácido tricloroacético (Sigma T6399) con agua desionizada hasta un volumen de 100 ml
 H. 0,1 M Tampón de acetato, pH 6,0
- 15 a. Disolver 8,203 g de acetato de sodio (Fisher S210) en 900 ml de agua desionizada
 b. Ajustar a un pH 6,0 con 1 M HCL y conseguir 1 l de volumen con agua desionizada
- I. 0,2 M de tampón de acetato, pH 6,8
- 20 a. Disolver 16,406 g de acetato de sodio (Fisher S210) en 900 ml de agua desionizada
 b. Ajustar a un pH 6,8 y conseguir 1 l de volumen con agua desionizada
- J. Reactivo de color (hacer nuevo)
- 25 a. 3 volúmenes de ácido sulfúrico 1 M
- 30 i. En un matraz volumétrico, agregar 5,52 ml de ácido sulfúrico concentrado (18,1 M) (S6014) a 90 ml de agua desionizada, después, conseguir un volumen final de 100 ml
1. 40 ml de ácido sulfúrico 5 N agregados a 60 ml de agua desionizada
- 35 b. 1 volumen de 2,5 % (p/v) de molibdato de amonio
- i. Disolver 2,65 g de molibdato de amonio tetrahidratado (Sigma A7302) en 80 ml de agua desionizada, después, conseguir un volumen final de 100 ml
- 40 c. 1 volumen de 10 % (p/v) de ácido ascórbico
- i. Disolver 10 g de ácido ascórbico (Fisher BP351) en 80 ml de agua desionizada, después, conseguir un volumen final de 100 ml
- K. Solución DNS: almacenar en botella oscura durante 6 meses
- 45 a. Disolver 10 g de ácido dintrosalicílico (Sigma D0550) en 400 ml
 b. Disolver 16 g de NaOH (Fisher S318) en 150 ml de agua desionizada
 c. Agregar la solución de NaOH lentamente a la solución de ácido dintrosalicílico mientras se agita
 d. Colocar en un baño de agua a 50 °C hasta que todos los sólidos se disuelvan
 e. Añadir 300 g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado (Sigma 217255) mientras se agita
 f. Consecuir 1 l de volumen con agua desionizada
- 50 L. Niveles de dextrosa: diluir 1 g de dextrosa (Fisher D16) con agua desionizada para obtener un volumen de 100 ml A partir de esta solución madre, crear diluciones de dextrosa de lo siguiente:

Dilución de 1 g/100 ml de solución madre	Concentración de dextrosa (mg/ml)
0	0
1:50	0,2
1:25	0,4
1:16,67	0,6
1:12,5	0,8
1:10	1,0

M. Solución de fosfato de potasio (KH₂PO₄) 9 mM – para curva estándar

- a. Disolver 1,22 g de KH₂PO₄ (Fisher Sp361) en 800 ml de agua desionizada, después, conseguir un volumen final de 1 l

5

N. Niveles de fosfato: realice las siguientes diluciones de fosfato con la solución madre de fosfato 9 mM:

Dilución de 9,0 mM de fosfato	Concentración de fosfato (µM)
0	0
1:1600	5,625
1:800	11,25
1:400	22,5
1:200	45
1:100	90

Procedimiento

10

Extracción de SSF

1. Añadir 1 g de salvado de trigo SSF a 100 ml de agua desionizada en una botella de 125 ml con tapón.
2. Agitar a 250 durante 1 hora.
3. Diluir.
 - a. 1:500 (1 ml de SSF/4 ml de tampón de acetato de sodio 0,1 M), después, 1:5000 (1 ml de mezcla a 1:500/9 ml de tampón)

15

Etapa 1: Estómago

1. Triturar alimento y pasar la base de alimento a través de un tamiz de 1x1 mm.
2. Añadir 2 g de muestra en matraz de 250 ml.
 - a. 50 minutos para extraer SSF, agregar 50 ml de solución de acetato de sodio 0,1 M y agregar lentamente 20 ml de HCl 0,2 M mientras se agita
 - b. Cuando no haya enzimas en el alimento, agregar 1 ml de enzima + 49 ml de acetato de sodio
3. Ajustar a un pH 3 con HCl 4 M (~10 gotas), después, a un pH 2 con HCl 2 M (~10 gotas).
4. Agregar 2 ml de solución de pepsina (10 mg de pepsina/ml de agua desionizada, hacer nuevo) y 1,0 ml de solución de cloranfenicol (5 mg de cloranfenicol (Sigma C0378)/1 l de alcohol, hacer nuevo).
 - a. Ejemplo: Pepsina = 130 mg/13 ml de agua DI (6 matraces + 1 ml adicional)
 - b. Ejemplo: Cloranfenicol = 32,5 mg/6,5 ml de alcohol (6 matraces + 0,5 ml adicional)
5. Cubrir los matraces, agitar la solución y colocarlos en un baño de agua de agitación a 39 °C (55 RPM) durante 6 horas (usar pesos para evitar que los matraces floten).
 - a. Agitar bien los matraces cada hora para asegurar una buena mezcla

25

30

35

40

Etapa 2: Intestino delgado

1. Añadir 20 ml de tampón de acetato de sodio 0,2 M y 10 ml de NaOH 0,6 M (agregar lentamente mientras se agita).
2. Ajustar a un pH 6,8 con NaOH 0,6 M (20-25 gotas).
3. Agregar 2 ml de solución de pancreatina (50 mg/ml de agua DI + 2 ml adicionales; mezclar en el vaso de precipitados con la barra de agitación, enfriar).
4. Agitar la solución y colocarla en un baño de agua con agitación a 39 °C (55 RPM) durante 18 horas.
5. Agitar la solución, verter en el tubo de centrifugación Falcon y centrifugar a 14000 g durante 20 minutos.

50

Liberación de fosfato:

Referencia: Kim TW, Lei XG (2005), *An Improved Method for a Rapid Determination of Phytase in Animal Feed*, J. Animal science, 83:1062-1067

- 5 1. Después de la incubación, pipetear 1 ml de solución de detención de TCA al 15 % en 1 ml de sobrenadante justo antes de que se complete la centrifugación (utilizar duplicados), después, agitar con vórtex los tubos.
2. Centrifugar los tubos a 2.000x g durante 10 minutos.
- 10 a. El reactivo de color se puede preparar durante este momento
3. En tubos de ensayo limpios, mezclar 0,2 ml del sobrenadante con 1,8 ml de agua nanopura (18MΩ·cm). Agregar también 0,2 ml de cada estándar de fosfato a 1,8 ml de agua nanopura y agitar con vórtex. Mientras se agrega el sobrenadante, obtener una muestra de cada uno antes de agregar a los tubos.
- 15 4. Agregar 2,0 ml de reactivo de color nuevo a todos los tubos y agitar bien con vórtex.
5. Incubar todas las muestras en un baño de agua a 50 °C durante 15 minutos.
6. Permitir que todas las muestras alcancen la temperatura ambiente. Colocar el termómetro en un baño de agua a temperatura ambiente (20-25 °C).
- 20 7. Leer la absorbancia a 820 nm.
- a. Comparar los promedios de absorbancia con los estándares y calcular los mg de fosfato/kg de alimento
- b. Recordar tener en cuenta la dilución al calcular los resultados

Reducción de la liberación de azúcar:

- 25 Referencia: Miller (1959), *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar*, Anal. Chem. 31, 426-428
- 30 1. Diluir 1 ml de sobrenadante con agua desionizada si es necesario.
2. Colocar 1 ml de sobrenadante diluido en 1 ml de agua en un tubo de ensayo de vidrio (usar duplicados).
3. Pipetear 1 ml de cada solución estándar de dextrosa en 1 ml de agua en un tubo de ensayo de vidrio.
4. Agregar 3 ml de solución DNS a cada tubo de ensayo e inmediatamente agitar con vórtex y colocar en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos.
- 35 5. Colocar los tubos de ensayo hervidos en un baño de agua con hielo durante aproximadamente 2-3 minutos y luego deje que los tubos alcancen la temperatura ambiente. Colocar el termómetro en un baño de agua a temperatura ambiente (20-25 °C).
6. Leer la absorbancia a 540 nm
- a. Comparar los promedios de absorbancia con los estándares y calcular los g de azúcares reducidos/kg de alimento
- 40 b. Recordar tener en cuenta la dilución al calcular los resultados

Dilución de la enzima:

- 45 1. Determinar el factor de dilución.
2. Diluir 1:100 (1 g/100 ml) en agua DI.
3. Mezclar durante 60 min (RT, 250 RPM) en botellas de peptona.
4. Continuar las diluciones en tubos de 15 ml.
- 50 5. Consultar la etapa 1.3.

El procedimiento *in vitro* deja una masa final que consiste en alimento digerido y los componentes líquidos que se han agregado. Esta mezcla se filtró utilizando un papel de filtro de grado P8 y un embudo Buchner para obtener los componentes sólidos. La porción líquida se analizó para determinar el contenido de fósforo usando un sistema ICP mientras que la porción sólida se liofilizó. Esta masa liofilizada proporciona la porción final de materia seca. La materia seca se escanea utilizando NIR para la calibración. Una porción de la materia seca también se analiza para determinar el contenido de proteínas utilizando un analizador de combustión de nitrógeno. Otra porción se analiza en un calorímetro de bomba de la energía bruta. La tabla 1 muestra un conjunto de datos ejemplar para un alimento que se ha sometido a digestión *in vitro* y a análisis.

60 Se generó un modelo utilizando NIR y los datos obtenidos de las otras herramientas analíticas como datos de referencia. Los espectros NIR consisten en máximas que se relacionan con ciertos enlaces dentro de la estructura de una sustancia (por ejemplo, la proteína tiene sus propias máximas). Estas máximas se relacionan de nuevo con los datos de referencia obtenidos, de modo que después de obtener múltiples espectros y puntos de datos, se crea un modelo de predicción para un componente particular del alimento (por ejemplo, enzima). La figura 2 muestra un espectro NIR ejemplar. La figura 3 muestra la precisión de una predicción NIR de la concentración de proteína residual.

Tabla 1

Nombre	Dieta utilizada	% de proteína	promedio	Liberación de fósforo	promedio	Energía bruta	promedio	Restos de P	promedio
Matraz 1	Harina de soja	5,8255625	6,077813	964,9294136	972,3235	4283,47	4239,233	1046,38	1038,987
Matraz 2	Harina de soja	6,405		987,1116922		4191,84		1024,2	
Matraz 3	Harina de soja	6,002875		964,9294136		4242,39		1046,38	
Frasco + enzima 4	Harina de soja	5,6355	5,773125	1353,119289	1314,916	4263,09	4267,5	658,19	696,3933
Frasco + enzima 5	Harina de soja	5,7609375		1312,451778		4272,13		698,86	
Frasco + enzima 6	Harina de soja	5,9229375		1279,17836		4267,28		732,13	

5 Para los expertos en la materia serán evidentes diversas modificaciones y variaciones de las composiciones y métodos descritos de la invención. Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones preferidas específicas, debe entenderse que la invención reivindicada no debe limitarse indebidamente a tales realizaciones específicas. De hecho, se pretende que varias modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención, que son obvias para los expertos en los campos relevantes, se encuentren dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método de análisis del alimento para animales, que comprende la etapa de:
 - 5 a) digerir *in vitro* una muestra de alimento para animales utilizando al menos una enzima digestiva para generar alimento para animales digerido que comprende al menos un componente residual; caracterizado por:
 - b) escanear el alimento para animales digerido utilizando espectroscopia NIR para generar datos espectrales; y
 - 10 c) comparar los datos espectrales con un modelo informático para generar una concentración predicha de al menos un componente residual del alimento para animales digerido.
2. El método de la reivindicación 1, en donde al menos una enzima digestiva es pepsina o pancreatina o ambas.
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la digestión de la muestra del alimento para animales comprende además separar la muestra digerida en una porción de materia seca y una porción líquida y en donde escanear el alimento para animales digerido comprende escanear la porción de materia seca.
- 15 4. El método de la reivindicación 3, en donde la porción de materia seca se seca antes de escanear la porción de materia seca.
- 20 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde al menos un componente residual se selecciona del grupo que consiste en proteínas, fósforo, energía bruta e hidratos de carbono.
- 25 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la muestra de alimento para animales comprende un aditivo.
7. El método de la reivindicación 6, en donde el aditivo comprende una enzima.
- 30 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el método comprende además determinar el efecto del aditivo sobre la digestibilidad del alimento para animales comparando la concentración predicha del al menos un componente residual en la muestra de alimento para animales digerido, que comprende el aditivo, con una concentración predicha del al menos un componente residual en una muestra del alimento para animales digerido sin el aditivo.
- 35 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde los datos espectrales se comparan usando un método implementado por ordenador que comprende recibir datos espectrales desde la muestra digerida y comparar los datos espectrales con el modelo informático para obtener la concentración predicha del al menos un componente residual.

Figura 1

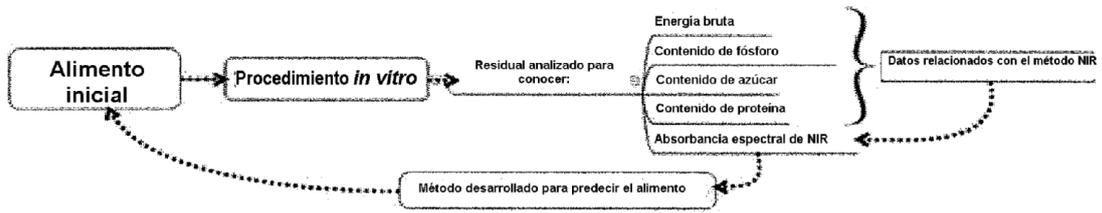


Figura 2

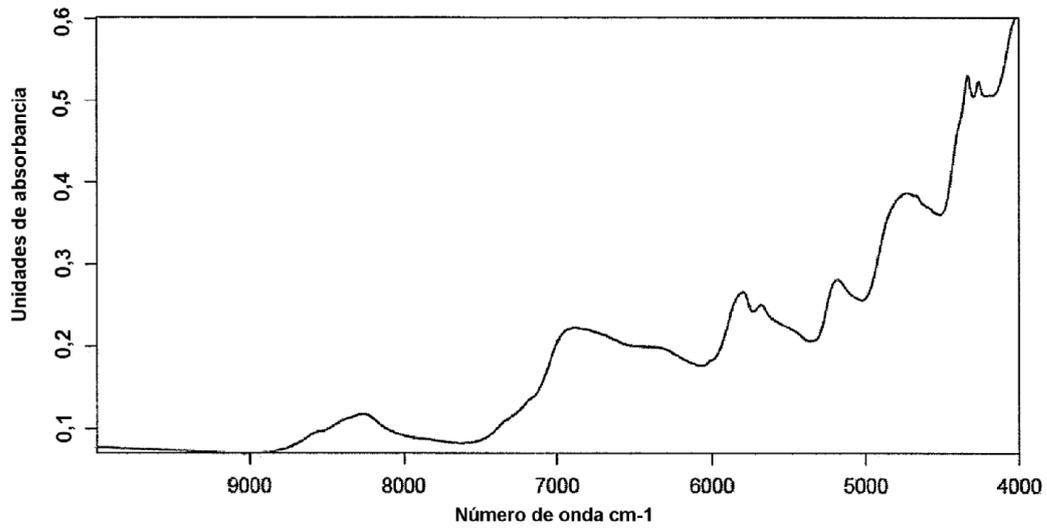


Figura 3

