

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 753 654**

51 Int. Cl.:

A23K 20/158 (2006.01)

A23K 20/195 (2006.01)

A23K 50/75 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.12.2015 PCT/SE2015/000080**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.06.2016 WO16093757**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2015 E 15866796 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019 EP 3229605**

54 Título: **Composición que inhibe patógenos Gram negativos en Galloanserae**

30 Prioridad:

09.12.2014 SE 1400579

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

13.04.2020

73 Titular/es:

**PERSTORP AB (100.0%)
284 80 Perstorp, SE**

72 Inventor/es:

**VAN IMMERSEEL, FILIP;
VAN DRIESSCHE, KAROLIEN;
DUCATELLE, RICHARD y
SCHWARZER, CONRAD GERARD**

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 753 654 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición que inhibe patógenos Gram negativos en *Galloanserae*

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una composición de éster de glicerol de al menos un ácido graso de cadena corta para su uso en inhibir una bacteria del género *Salmonella* en el tracto gástrico de *Galloanserae*. La composición de éster de glicerol comprende al menos el 75% en peso de trivalerato de glicerilo, menos del 25% en peso de divalderato de glicerilo y menos del 8% en peso de monovalerato de glicerilo.

Antecedentes de la invención

Enfermedad transmitida por los alimentos (también enfermedad de origen alimentario o intoxicación alimentaria) es cualquier enfermedad que resulta del consumo de alimentos contaminados, bacterias patógenas, virus, o parásitos que contaminan alimentos así como toxinas químicas o naturales tales como hongos venenosos. Los síntomas incluyen a menudo vómitos, fiebre y dolores, y pueden incluir diarrea. La enfermedad transmitida por los alimentos habitualmente proviene de manipulación, preparación o almacenamiento incorrecto de los alimentos; factores que el propio consumidor puede controlar en cierto grado. Sin embargo, con el fin de minimizar el número de casos de enfermedad transmitida por los alimentos, es vital que los alimentos que se producen y venden a los consumidores sean seguros.

Entre las bacterias más comunes causantes de enfermedad transmitida por los alimentos en humanos están *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* y *Escherichia coli*. Estas tres bacterias están todas clasificadas como Gram negativas. La tinción de Gram distingue bacterias por las propiedades físicas y químicas de sus paredes celulares mediante la detección de peptidoglicano que está presente en una capa gruesa en bacterias Gram positivas. En una prueba de tinción de Gram, las bacterias Gram positivas retienen el colorante de cristal violeta, mientras que una tinción de contraste (normalmente safranina o fucsina) añadida tras el cristal violeta da a todas las bacterias Gram negativas un color rojo o rosa.

Salmonella es sistemáticamente el patógeno bacteriano más común en casos de enfermedad transmitida por los alimentos confirmados en laboratorio. Hay dos especies distintas del género *Salmonella*: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. *S. enterica* se encuentra principalmente en aves de corral y productos de aves de corral. En muchos casos la *Salmonella* está viviendo libremente en los animales durante su crecimiento, sin que los pollos muestren síntoma alguno de enfermedad. El resultado es que la *Salmonella* aún está presente en la carne de aves de corral y los huevos, capaz de infectar humanos cuando se consumen estos productos. Para proteger contra la infección por *Salmonella*, se recomienda calentar los alimentos durante al menos diez minutos a 75°C, de forma que el centro de los alimentos alcance esta temperatura. Los alimentos calentados de forma incompleta o la contaminación entre diferentes alimentos durante la preparación y/o la cocción puede dar como resultado que los consumidores se infecten por *Salmonella*.

La mayoría de las personas infectadas por *Salmonella* presenta diarrea, fiebre, vómitos y espasmos abdominales dentro de las 12 a 72 horas después de la infección. En la mayoría de los casos, la enfermedad dura de cuatro a siete días, y la mayoría de las personas infectadas se recupera sin tratamiento. En algunos casos, la diarrea puede ser tan grave que el paciente llega a deshidratarse peligrosamente y debe ser hospitalizado. Es más probable que los ancianos, lactantes y aquellos con sistemas inmunitarios alterados presenten enfermedad grave. En casos graves, la infección por *Salmonella* puede propagarse desde los intestinos hasta el torrente sanguíneo, y luego a otras partes de cuerpo y puede causar la muerte, a menos que la persona se trate inmediatamente con antibióticos. Se estima que la *Salmonella* causa más de 1,2 millones de enfermedades cada año en los Estados Unidos, con más de 23.000 hospitalizaciones y 450 muertes.

Debido al riesgo de que los consumidores se infecten por *Salmonella*, es de gran interés para los granjeros, la industria de la alimentación y los consumidores finales encontrar maneras de controlar *Salmonella* y otros patógenos en los animales que consumimos, por ejemplo en aves de corral. Esto se ha conseguido anteriormente añadiendo habitualmente antibióticos a los piensos. Desde la prohibición de los antibióticos promotores del crecimiento en la Unión Europea en 2006, existe una gran necesidad de métodos alternativos para prevenir infecciones por *Salmonella* en animales y especialmente en *Galloanserae*. *Galloanserae* se divide en los subgrupos de galliformes (aves terrestres) como pollos, pavos, urogallos y faisanes, y anseriformes (aves acuáticas) como patos, gansos y cisnes.

El uso de diferentes ácidos grasos de cadena corta como agentes antibacterianos contra por ejemplo *Salmonella* se conoce desde hace mucho tiempo en la técnica anterior, por ejemplo en el documento EP 2 215 913 A1 que describe el uso de ácido válérico en la supresión de *Salmonella* en aves de corral y el documento WO99/66804 con una enseñanza más general. Usar ésteres de glicerol de ácidos grasos de cadena corta es una manera alternativa para distribuir estos ácidos al tracto gastrointestinal de un animal. Existen varias ventajas asociadas con la distribución de los ácidos en forma de ésteres de glicerol. Estos ácidos son a menudo corrosivos y tienen un olor

acre, desagradable, que causa problemas de manipulación.

Los ésteres de glicerol no tienen estos problemas con el olor o la corrosividad. Distribuir ácidos grasos de cadena corta a un animal en forma de ésteres de glicerol es también una buena manera de transportar los ácidos grasos a las regiones inferiores del tracto gastrointestinal de un animal. Es probable que los ácidos grasos de cadena corta libres se adsorban en las regiones superiores del canal gastrointestinal y nunca alcancen el ciego o intestino grueso. Por otro lado, los ésteres de glicerol alcanzarán probablemente en gran parte estas regiones en forma parcialmente disociada y una alta proporción del ácido graso se liberará y adsorberá en estas regiones.

La presente invención muestra que un triéster de glicerol específico es más eficaz que otros ésteres comparables para inhibir el crecimiento de *Salmonella* en pollos. Se ha encontrado sorprendentemente que una composición de éster de glicerol que comprende principalmente trivalerato de glicerol reduce el recuento bacteriano en los ciegos de pollos de engorde infectados por *Salmonella* en mayor medida comparada con una composición de éster de glicerol que comprende principalmente tripropionato de glicerol o tributirato de glicerol. Se encontró que el recuento bacteriano de *Salmonella* en los pollos suministrados con trivalerato de glicerol estaba disminuido también comparado con el de los pollos suministrados con monovalerato de glicerol. Esto muestra que una composición de éster de glicerol según la presente invención que comprende principalmente trivalerato de glicerol es una elección particularmente buena para inhibir bacterias Gram negativas como *Salmonella* en *Galloanseræ*.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al uso de una composición de éster de glicerol que comprende al menos un ácido graso de cadena corta para controlar una bacteria del género *Salmonella* en el tracto gástrico de *Galloanseræ*, tal como un pollo de engorde. La composición de éster de glicerol comprende al menos 75% en peso de trivalerato de glicerilo, menos del 25% en peso de divalderato de glicerilo y menos del 8% en peso de monovalerato de glicerilo. La presente invención se refiere por consiguiente a dicha composición de éster de glicerol para su uso en la inhibición de una bacteria del género *Salmonella* en el tracto gástrico de *Galloanseræ*. La bacteria del género *Salmonella* puede ser *Salmonella enterica*.

Para evitar que *Galloanseræ*, y más adelante en la cadena de valor los humanos, se infecten por patógenos comunes transmitidos por los alimentos como las bacterias Gram negativas *Salmonella*, se ha descrito anteriormente el uso de diferentes ácidos grasos de cadena corta.

La presente invención muestra que usar una composición de éster de glicerol que comprende principalmente trivalerato de glicerol es una manera más eficiente de controlar una bacteria del género *Salmonella* en el tracto gástrico de *Galloanseræ* que usar o bien una composición que comprende principalmente tripropionato de glicerol, o bien una composición que comprende principalmente tributirato de glicerol o bien una composición que comprende principalmente monovalerato de glicerol.

Según una realización de la presente invención, la composición de éster de glicerol comprende al menos el 80% en peso de trivalerato de glicerilo, menos del 20% en peso de divalderato de glicerilo y menos del 5% en peso de monovalerato de glicerilo.

Según una realización preferida de la presente invención, la composición de éster de glicerol comprende al menos el 85% en peso de trivalerato de glicerilo, menos del 15% en peso de divalderato de glicerilo y menos del 4% en peso de monovalerato de glicerilo.

Según una realización más preferida de la presente invención, la composición de éster de glicerol comprende al menos el 90% en peso de trivalerato de glicerilo, menos del 10% en peso de divalderato de glicerilo y menos del 2,5% en peso de monovalerato de glicerilo.

El ácido valérico libre tiene un olor desagradable que causa problemas de manipulación. Estos problemas pueden evitarse distribuyendo el ácido valérico en forma de ésteres de glicerol. Según una realización de la presente invención, la cantidad de ácido valérico libre en la composición de éster de glicerol es de menos del 1% y preferiblemente menos del 0,5% en peso. Mantener baja la cantidad de ácido valérico libre asegura también que el pH en la composición de éster de glicerol se mantiene a un nivel en el que el éster de glicerol no sufrirá hidrólisis para formar glicerol y ácido libre, así, el producto se mantiene estable.

Según una realización de la presente invención, la composición de éster de glicerol se adsorbe en un portador inerte, tal como un portador de sílice. Esto permite que la composición se distribuya como producto seco. Un portador de sílice de este tipo preferiblemente comprende partículas de sílice porosas con un tamaño de partícula promedio de 20-70 µm. Según una realización de la presente invención, la composición de éster de glicerol se adsorbe en partículas de sílice en una razón en peso del 50-80% de éster de glicerol y el 20-50% de partículas de sílice.

La composición de éster de glicerol según la presente invención puede añadirse a cualquier pienso comercialmente

disponible para *Galloanseræ*. La composición de éster de glicerol puede incorporarse directamente en piensos comercialmente disponibles o suministrarse como complemento a piensos comercialmente disponibles.

- 5 Según una realización de la presente invención, la cantidad de composición de éster de glicerol suministrada a *Galloanseræ* es desde el 0,05 hasta el 1,5% en peso y preferiblemente desde el 0,1 hasta el 1,0% en peso de la ración de alimentación diaria del *Galloanseræ*.

Ejemplo de realización

- 10 Ensayo *in vivo* que muestra la eficacia de diferentes composiciones de éster de glicerol para inhibir infección bacteriana por *Salmonella enteritis* en los ciegos de un pollo de engorde.

15 Se suministró un pienso comercial a cinco grupos de 20 pollos en cada uno desde el día 1 hasta el día 14. Se añadieron las composiciones sometidas a prueba al pienso a las concentraciones a continuación durante el ensayo completo.

Grupo 1: control positivo (no se añade nada de éster de glicerol)

- 20 Grupo 2: 3 kg/ton de tripropionato de glicerilo (adsorbido en un portador de sílice)

Grupo 3: 3 kg/ton de tributirato de glicerilo (adsorbido en un portador de sílice)

Grupo 4: 3 kg/ton de trivalerato de glicerilo (adsorbido en un portador de sílice)

- 25 Grupo 5: 5,6 kg/ton de monovalerato de glicerilo (adsorbido en un portador de sílice)

30 Se tomaron hisopos en los días 1 y 10 para cerciorarse de que los animales eran negativos para *S. enteritis*. Se inocularon los pollos con $2 \cdot 10^5$ UFC de una *Salmonella enteritis* de tipo natural en el día 10 y se tomaron hisopos diariamente hasta el día 14. Se sometieron a eutanasia todos los pollos en el día 14 mediante la inyección intravenosa de pentobarbital de sodio.

Se determinó el recuento bacteriano de *Salmonella enteritis* en los ciegos en log UFC/g. Se clasificaron los animales en seis clases diferentes según la tabla 1 a continuación.

Clase	Recuento bacteriano (UFC/g)	Puntuación de infección del animal
1	< log 0	1
2	< log 2	2
3	< log 4	3
4	< log 6	4
5	< log 8	5
6	> log 8	6

35 Tabla 1.

40 Se clasificaron todos los animales como pertenecientes a una de las seis clases anteriores. Los animales pertenecientes a la clase 1, por ejemplo, tenían un recuento bacteriano de menos de log 0 (ninguna detección de bacterias) mientras que un animal clasificado como de clase 6 tenía un recuento bacteriano de log 8 o superior. Para visualizar los resultados, se asignó a todos los animales una puntuación de 1-6, representando una puntuación superior un recuento bacteriano superior (véase tabla 1). Se muestran en la tabla 2 a continuación las puntuaciones de infección totales para todos los 20 animales en cada uno de los cinco grupos de animales sometidos a prueba.

Grupo de animales	n.º de puntuación 1	n.º de puntuación 2	n.º de puntuación 3	n.º de puntuación 4	n.º de puntuación 5	n.º de puntuación 6	Puntuación de infección total para el grupo
Control	3	0	9	3	1	4	$3 \cdot 1 + 0 \cdot 2 + 9 \cdot 3 + 3 \cdot 4 + 1 \cdot 5 + 4 \cdot 6 = 71$
Tripropionato de glicerilo	6	2	7	5	0	0	51
Tributirato de glicerilo	2	0	9	6	3	0	68
Trivalerato de glicerilo	8	3	7	1	1	0	44
Monovalerato de glicerilo	3	0	11	5	1	0	61

Tabla 2.

Los resultados en la tabla 2 se visualizan en la figura 1 a continuación:

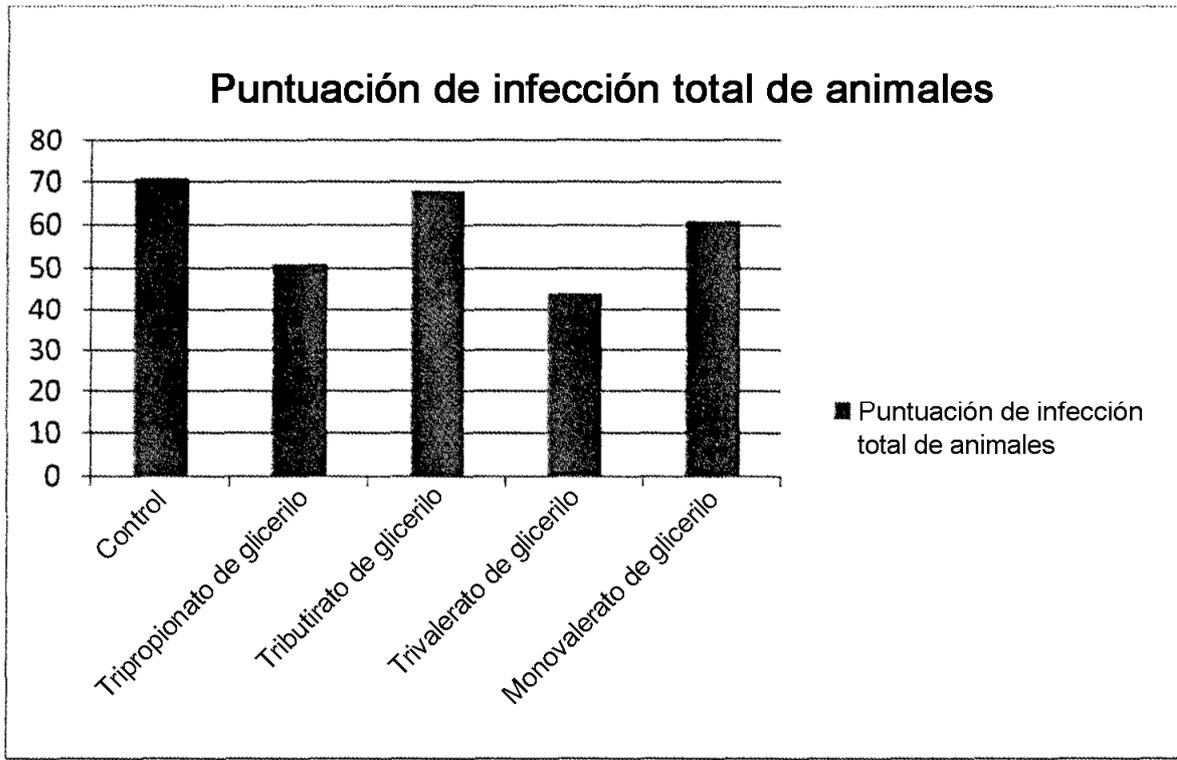


Figura 1.

- 5 La figura 1 muestra que la puntuación de infección total de animales fue menor en el grupo de pollos a los que se suministró trivalerato de glicerilo, en comparación con los grupos en los que se suministró a los pollos tripropionato de glicerilo, tributirato de glicerilo o monovalerato de glicerilo.
- 10 Los resultados muestran que usar una composición de éster de glicerol según la presente invención que comprende una gran proporción de trivalerato de glicerilo es una manera eficaz de inhibir infección por *Salmonella enterica* en *Galloanserae*.
- 15 El ejemplo de realización debe interpretarse como ilustrativo y no limitante de ninguna manera. La composición de éster de glicerol puede comprender por ejemplo una mezcla de ésteres de glicerol de diferentes ácidos grasos de cadena corta, tales como ácido valérico, ácido propiónico y ácido butírico. Los niveles de dosificación deberán calcularse entonces con respecto a la cantidad total de ésteres de glicerol.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición de éster de glicerol de al menos un ácido graso de cadena corta, en la que la composición de éster de glicerol comprende al menos el 75% en peso de trivalerato de glicerilo, menos del 25% en peso de divalderato de glicerilo y menos del 8% en peso de monoalderato de glicerilo, para su uso en la inhibición de patógenos Gram negativos en el tracto gástrico de *Galloanserae*, en la que dicho patógeno Gram negativo es una bacteria del género *Salmonella*.
- 10 2. Composición de éster de glicerol para su uso según la reivindicación 1, en la que dicho patógeno Gram negativo es *Salmonella enterica*.
3. Composición de éster de glicerol para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicho *Galloanserae* es un galliforme, tal como pollo, pavo, urogallo o faisán.
- 15 4. Composición de éster de glicerol para su uso según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicho *Galloanserae* es un anseriforme, tal como pato, ganso o cisne.
- 20 5. Composición de éster de glicerol para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que dicha composición de éster de glicerol comprende al menos el 80% en peso de trivalerato de glicerilo, menos del 20% en peso de divalderato de glicerilo y menos del 5% en peso de monoalderato de glicerilo.
- 25 6. Composición de éster de glicerol para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que dicha composición de éster de glicerol comprende al menos el 85% en peso de trivalerato de glicerilo, menos del 15% en peso de divalderato de glicerilo y menos del 4% en peso de monoalderato de glicerilo.
7. Composición de éster de glicerol para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en la que dicha composición de éster de glicerol comprende al menos el 90% en peso de trivalerato de glicerilo, menos del 10% en peso de divalderato de glicerilo y menos del 2,5% en peso de monoalderato de glicerilo.
- 30 8. Composición de éster de glicerol para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la cantidad de ácido valérico libre en dicha composición de éster de glicerol está menos del 1% en peso.
9. Composición de éster de glicerol para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la cantidad de ácido valérico libre en dicha composición de éster de glicerol está menos del 0,5% en peso.
- 35 10. Composición de éster de glicerol para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que dicha composición de éster de glicerol se adsorbe sobre un portador, tal como un portador de sílice, permitiendo de ese modo que se distribuya dicha composición de éster de glicerol como producto seco.
- 40 11. Composición de éster de glicerol para su uso según la reivindicación 10, en la que dicho portador comprende partículas de sílice porosas con un tamaño de partícula promedio de 20-70 μm .
- 45 12. Composición de éster de glicerol para su uso según la reivindicación 10, en la que dicha composición de éster de glicerol se adsorbe sobre partículas de sílice en una razón en peso del 50-80% de éster de glicerol y el 20-50% de partículas de sílice.
- 50 13. Composición de éster de glicerol para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que dicha composición de éster de glicerol se suministra a dicho *Galloanserae* en una cantidad entre el 0,05 y el 1,5% en peso de la ración de alimentación diaria del *Galloanserae*.
14. Composición de éster de glicerol para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que dicha composición de éster de glicerol se suministra a dicho *Galloanserae* en una cantidad entre el 0,1 y el 1,0% en peso de la ración de alimentación diaria del *Galloanserae*.