

Señores

Superintendencia de Industria y Comercio

Dirección de Nuevas Creaciones

E. S. D.

Ref: Expediente No. NC2018/0008693.

Solicitud de registro de Patente de Invención denominada “PRODUCTO ALIMENTICIO PARA ANIMALES QUE COMPRENDE ÁCIDO ELÁGICO, P-CIMENOL, ALÍINA Y CARVACROL, Y PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN”.

Solicitante: BIOVET.

Luz Helena Adarve, identificada como aparece al pie de mi firma, y obrando en mi condición de apoderada de **BIOVET**, solicitante de la patente en referencia, a continuación doy respuesta al Oficio **No. 11817** del 22 de septiembre de 2020.

1. Respecto al título de la solicitud

Aunque el título de la solicitud no fue objetado, debido a que examinador declara que la expresión “*Alquernat Nebsui*” es ambigua e imprecisa para las reivindicaciones, es solicitante pide eliminar dicha expresión del título de la solicitud como se muestra a continuación:

“PRODUCTO ALIMENTICIO ~~ALQUERNAT NEBSUI~~ PARA ANIMALES QUE COMPRENDE ÁCIDO ELÁGICO, P-CIMENOL, ALÍINA Y CARVACROL, Y PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN”

De acuerdo a lo anterior, es solicitante pide que quede el siguiente título:

“PRODUCTO ALIMENTICIO PARA ANIMALES QUE COMPRENDE ÁCIDO ELÁGICO, P-CIMENOL, ALÍINA Y CARVACROL, Y PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN”.

2. Respecto al resumen de la solicitud

Aunque el resumen de la solicitud no fue objetado, debido a que examinador declara que la expresión “*Alquernat Neb sui*” es ambigua e imprecisa, el solicitante pide eliminar dicha expresión del resumen de la solicitud para que quede de la siguiente forma:

“La presente invención se refiere a un producto alimenticio para animales que comprende ácido elágico, p-cimanol, aliína y carvacrol. La presente invención también se refiere a un procedimiento para la obtención del producto alimenticio según el primer aspecto de la invención”.

3. Respecto a las Objeciones a la Claridad y Concisión de las reivindicaciones (Artículo. 30 de la Decisión 486).

En el numeral 2.1 del oficio No. **11817**, se presentan la siguiente objeción a la claridad de las reivindicaciones:

“Las reivindicaciones incluyen términos y expresiones, tales como “Alquernat Neb sui, como mínimo, aproximadamente, utilizar” que son ambiguas e imprecisas y no permiten definir específicamente la materia reclamada. Sírvasse eliminarlas“

Con el fin de superar las objeciones presentadas respecto a la claridad y concisión de las reivindicaciones, **es deseo del solicitante presentar un nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por 20 reivindicaciones**, que encuentran su debido sustento en las reivindicaciones y la descripción originalmente presentadas, sin que ello conlleve ampliación de la invención.

Adicionalmente se modifica el capítulo descriptivo para eliminar algunas de las expresiones que el examinador considera ambiguas e imprecisas.

A continuación se explicará cómo este nuevo capítulo reivindicatorio busca superar cada una de las objeciones de claridad expuestas previamente:

- Sobre la expresión “*Alquernat Nebsu*” que correspondía al nombre comercial del producto, se indica que dicha expresión fue eliminada y reemplazada por la expresión “*producto alimenticio*”. Dicha expresión también fue eliminada del capítulo descriptivo.
- Sobre la expresión “*como mínimo*”, se eliminó y se reemplazó por “*en un mínimo*”. La expresión “*en un mínimo*” es clara y concisa porque define la cantidad mínima de las sustancias que componen el producto alimenticio que se reclama en la presente solicitud y dicha expresión es clara, entendible e inequívoca.
- Sobre la expresión “*aproximadamente*”, se indica que dicha expresión fue eliminada de acuerdo a las indicaciones del examinador. Dicha expresión también fue eliminada del capítulo descriptivo.
- Sobre la expresión “*utilizar*”, se indica que dicha expresión fue eliminada. Sin embargo se mantiene la característica correspondiente a que la fase líquida se absorbe con bentonita la cual se parafraseo eliminando la palabra “*utilizar*”.

4. Respecto a la Determinación del Estado de la Técnica y al Examen de Patentabilidad

En los numerales 3, 4 y 5 del oficio citado, ese Despacho concluye que las reivindicaciones de la presente solicitud de patente carecen de nivel inventivo frente a las enseñanzas de los documentos **ES2604303 (D1)** y **WO2016187422 (D2)**.

4.1. Novedad y Nivel Inventivo

Aunque el Examinador haya citado los documentos D1 y D2 para objetar la altura inventiva de la presente invención, es posible afirmar que éstos no enseñan las características esenciales de la invención que se reclama en el nuevo capítulo reivindicatorio que ahora se presenta.

Con el fin de superar las objeciones presentadas respecto al nivel inventivo de las reivindicaciones, **es deseo del solicitante presentar un nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por 20 reivindicaciones**, que encuentran su debido

sustento en las reivindicaciones y la descripción originalmente presentadas, sin que ello conlleve ampliación de la invención.

Primero se indica que las reivindicaciones 1 y 14, se modificaron con el objetivo de que sean aún más clara su novedad y nivel inventivo donde ahora incluyen como componente del producto alimenticio la materia de la antigua reivindicación 13 correspondiente a un extracto con carvacrol en un porcentaje en peso de dicho extracto entre el 12 y el 15 % que no es divulgado ni sugerido por los documentos D1 o D2.

De acuerdo a lo anterior la reivindicación 1 ahora incluye la siguiente característica *“en el que el carvacrol está presente en un extracto en un porcentaje en peso entre el 12 y el 15 % en peso de dicho extracto”*, y la reivindicación 14, la siguiente *“donde dicho extracto de carvacrol tiene un porcentaje entre el 12 y el 15 % en peso de carvacrol”*.

El documento D1 corresponde a una patente del mismo solicitante de la presente solicitud y divulga un producto alimenticio con ácido elágico, p-cimenol y alíina (Documento D1, Resumen).

Sin embargo, el documento D1 no menciona ni sugiere un extracto con carvacrol como compuesto de dicho producto alimenticio y mucho menos que dicho extracto tenga un porcentaje entre 12 y 15 % de carvacrol.

Por su parte, el documento D2 divulga composiciones para el tratamiento de animales con aceites esenciales, y métodos para fabricar y usar tales composiciones en donde las composiciones comprenden una fracción de aceite esencial que incluye aceite esencial de orégano, aceite esencial de tomillo y aceite esencial de canela (Documento D2, Resumen).

Sin embargo, el documento D2 no menciona en general un producto alimenticio compuesto por extractos y, en específico, no menciona el contenido de ácido elágico, no menciona el contenido de alíina, no menciona un extracto con carvacrol y mucho menos que dicho extracto de carvacrol tenga un porcentaje entre 12% y 15% de carvacrol.

El producto del documento D2 es a base de aceites esenciales de Thymus, Organum y Cinnamon; mientras que la presente solicitud se trata de extractos de

Punica, Allium, Thymus y Oreganum, por tanto, las diferencias son evidentes. Distintas combinaciones, dan resultados diferentes. Además, en la invención del documento D2 se trabaja con aceites esenciales y en la presente solicitud con extractos y, por lo tanto, se observa a simple vista que los productos son diferentes sustancialmente.

Debido a las anteriores diferencias se indica que el nuevo capítulo reivindicatorio que ahora se presenta es **novedoso**.

Ahora bien, las nuevas reivindicaciones que ahora se presentan no solo son novedosas sino con nivel inventivo porque, para la persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, el producto alimenticio que se reclama en la presente solicitud no resulta obvia ni se deriva de manera evidente del estado de la técnica.

El documento más cercano correspondiente al documento D1 falla en incluir un extracto que tenga un porcentaje entre 12 y 15 % de carvacrol y esta característica **no es obvia ni evidente** en conocimiento del documento D2.

El documento D2 trata de una composición con aceites esenciales y aunque menciona que dicha composición puede comprender aceite esencial de orégano con al menos 45% de carvacrol o una cantidad efectiva de al menos 10% de carvacrol en la composición (ver párrafo [0045]), o una cantidad de al menos 60.4% de carvacrol en la composición (ver párrafo [0067]), el documento D2 no menciona ni sugiere incluir un extracto que tenga un porcentaje entre 12 y 15 % de carvacrol.

Primero se hace notar que la invención del documento D2 es un producto compuesto por aceites esenciales y, en contraste, la invención de la presente solicitud en un producto compuesto por extractos lo que en el campo técnico es diferente.

Los extractos no son lo mismo que los aceites esenciales como se evidencia en las siguientes referencias:

- <https://www.bustle.com/p/whats-the-difference-between-extracts-oils-in-skin-care-how-to-tell-whats-actually-in-your-beauty-products-57886>

- <https://greenherbology.com/2017/11/06/4-major-differences-between-essential-oils-and-extracts/>
- <http://gralinco.com/diferencia-entre-aceites-vegetales-y-aceites-esenciales/>
- <https://es.quora.com/Cu%C3%A1l-es-la-diferencia-entre-extracto-y-aceite-esencial>

Los aceites esenciales, según el conocimiento de la persona del oficio que se evidencia en las referencias de más arriba, son concentraciones de los elementos aromáticos y volátiles, mientras que los extractos son versiones más diluidas que no necesariamente concentran dichos compuestos volátiles y aromáticos. El documento D2 apoya esta diferencia cuando en su párrafo [0017] recita que los aceites esenciales se refieren a los líquidos aromáticos y volátiles extraídos de material vegetal (ver documento D2 párrafo [0017]).

Aunque fuera de contexto desprevenidamente podría llegarse a interpretar que los ‘*aceites esenciales*’ corresponden a ‘*extractos*’ es claro que, dentro del campo técnico de la invención, los ‘*aceites esenciales*’ son diferentes a los ‘*extractos*’ y por lo tanto le pedimos amablemente al examinador que reconozca el lenguaje y terminología utilizado en el campo técnico de la invención que es el que aplica en la interpretación de las reivindicaciones, para reconocer las diferencias de la presente invención con el estado del arte.

De todas maneras, con el objetivo de hacer más evidente esta diferencia entre el uso de ‘*extractos*’ y ‘*aceites esenciales*’, donde los extractos son menos concentrados que los ‘*aceites esenciales*’ (y por lo tanto menos costosos), se incluyó explícitamente que el extracto de carvacrol que es un componente del producto alimenticio contiene entre 12% y 15% de carvacrol en las nuevas reivindicaciones 1 y 14 (nótese que el porcentaje de carvacrol en dicho extracto, no se refiere al total de carvacrol en el producto, sino al porcentaje en uno de sus componente).

El documento D2 no menciona concentraciones entre el 12% y 15% de carvacrol en uno de los componentes del producto justamente porque el interés del documento D2 se centra en ‘*aceites esenciales*’ que son más concentrados (y por lo tanto más costosos). Por ejemplo, el documento D2 menciona que uno de los componentes del producto es aceite esencial de orégano que tiene mínimo 45% de carvacrol (ver

párrafo [0045] del documento D2) lo que es claramente más alto que el porcentaje entre 12% y 15% que se reclama en la presente solicitud.

Nótese que aunque el documento D2 en su párrafo [0045] también menciona que *“una cantidad eficaz de carvacrol puede comprender al menos aproximadamente un 10% en peso”*, dicho 10% se refiere a la **cantidad total de Carvacrol** en el producto final y no se refiere a la cantidad de carvacrol en uno de sus compuestos. En contraste, la cantidad entre 12% y 15% de carvacrol que se reclama en las reivindicaciones 1 y 14 se refiere a la cantidad de carvacrol en uno de sus insumos (el extracto de carvacrol) y por lo tanto es diferente a lo divulgado por el documento D2 en su párrafo [0045].

La ventaja de un producto alimenticio que comprende extractos en vez de aceites esenciales, en especial usar un extracto con carvacrol en un porcentaje entre el 12% y el 15%, es una buena alimentación animal (como se evidencia en los resultados expuestos en la tablas 1 a 4 de la descripción de la presente solicitud) con un producto que mantiene una más baja exigencia en la obtención de sus componente y, por lo tanto, manteniendo un coste de producción más bajo que si se utilizaran aceites esenciales.

La persona del oficio en conocimiento del documento D1 y D2 se alejaría de la invención que ahora se reclama porque, partiendo del documento D1, incluiría los aceites esenciales divulgados en D2 que tienen concentraciones altas de carvacrol (concentraciones por encima de 45%) en vez de utilizar extractos con concentraciones más bajas, entre 12% y 15%, como se requiere en la presente invención.

Por todo lo anterior se concluye que las reivindicaciones independientes en cuestión poseen características que no se dan a conocer de manera obvia para una persona versada en la materia por los documentos D1 o D2, por ende la presente invención debe ser considerada como novedosa y con nivel inventivo sobre el estado de la técnica presentado por el Examinador.

5. Conclusión

Las modificaciones realizadas a las reivindicaciones de la presente solicitud de patente y las aclaraciones presentadas a lo largo del presente escrito permiten

superar completamente las objeciones realizadas a la claridad de las reivindicaciones, por lo cual, la presente solicitud cumple a cabalidad las exigencias establecidas por el artículo 30 de la Decisión 486 según los requerimientos del Examinador.

De otra parte, los argumentos expuestos en el numeral 3 del presente escrito ponen de manifiesto de una manera clara y contundente que lo revelado en las nuevas reivindicaciones de la presente solicitud resulta completamente NOVEDOSO E INVENTIVO sobre las enseñanzas del estado del arte más cercano representado por los documentos D1 y D2, toda vez que nada dentro de dichos documentos revela en forma directa o al menos llega a sugerir una codificación de entropía para diferencias de vector de movimiento, como lo hace la solicitud. Por consiguiente, no se puede derivar la inexistencia de los requisitos de ley para la concesión del privilegio de patentabilidad.

En consecuencia, me permito solicitar a ese Despacho, proceder con la revisión de las modificaciones y de los argumentos aquí presentados, para conceder el privilegio de patente solicitado para la materia objeto de las 20 reivindicaciones ahora presentadas en el capítulo reivindicatorio modificado, y que de subsistir alguna duda o inquietud respecto a la patentabilidad de la presente invención, a pesar de las modificaciones y argumentos técnicos ahora presentados, sin apartarse del espíritu inventivo originalmente revelado en la solicitud internacional, se le brinde la oportunidad al solicitante de aclararla o de limitar aún más la invención, mediante la emisión de un segundo examen de fondo, teniendo en cuenta el nuevo capítulo reivindicatorio que se somete a revisión, antes de que se emita una decisión definitiva por parte de ese Despacho, de conformidad con lo dispuesto en 1.2.2.5.1 del artículo primero de la Resolución 54093 de 2012.

6. Anexos

Junto con este escrito se incluye lo siguiente:

- Capítulo descriptivo modificado en donde se han llevado a cabo las modificaciones mencionadas anteriormente.
- Capítulo reivindicatorio modificado, en donde se han llevado a cabo las modificaciones mencionadas anteriormente.

7. Pagos

Junto con esta respuesta se paga la tasa correspondiente a la modificación al cuerpo de la solicitud.

Petición

Solicito al Despacho, y en el evento que el examinador considere que pese a las modificaciones presentadas aún existen objeciones, que proceda a emitir un segundo examen de fondo sobre el nuevo capítulo reivindicatorio presentado.

En este sentido, y de acuerdo con lo establecido en el inciso segundo del numeral 1.2.2.5.1 del Capítulo Primero del Título X de la Circular Única, requiero se me comunique a través del SIPI o cualquier otro medio la existencia de estas objeciones para, de esta manera, proceder a realizar el nuevo pago del examen de patentabilidad de la solicitud de la referencia.

Atentamente,



LUZ HELENA ADARVE GÓMEZ.

C.C 41.575.435 de Bogotá.

T.P. 14.884 C.S.J.

FJG

P-989

REIVINDICACIONES (con marcas de corrección)

- 1.- Producto alimenticio ~~Alquernat Nebsui~~ para animales que comprende ácido elágico, p-cimenol, aliína y carvacrol, en el que el carvacrol está presente en un extracto en un porcentaje en peso entre el 12 y el 15 % en peso de dicho extracto.
- 2.- Producto alimenticio~~Alquernat Nebsui~~, según la reivindicación 1, en el que el ácido elágico está presente en un como-mínimo del 2,25% en peso en dicho producto.
- 3.- Producto alimenticio~~Alquernat Nebsui~~, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el p-cimenol está presente en un como-mínimo del 3,5% en peso en dicho producto.
- 4.- Producto alimenticio~~Alquernat Nebsui~~, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la aliína está presente en un como-mínimo del 5,5 % en peso en dicho producto.
- 5.- Producto alimenticio~~Alquernat Nebsui~~, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el carvacrol está presente en un como-mínimo del 2.4 % en peso en dicho producto.
- 6.- Producto alimenticio~~Alquernat Nebsui~~, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el ácido elágico está contenido en harina de *Punica granatum*.
- 7.- Producto alimenticio~~Alquernat Nebsui~~, según la reivindicación 6, en el que el ácido elágico está presente en la harina de *Punica granatum* en un porcentaje en peso entre el 2 y el 4 % en peso.
- 8.- Producto alimenticio~~Alquernat Nebsui~~, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el p-cimenol está contenido en un extracto de *Thymus vulgaris*.
- 9.- Producto alimenticio~~Alquernat Nebsui~~, según la reivindicación 8, en el que el p-cimenol está presente en dicho extracto en un porcentaje en peso entre el 15 y el 17 % en peso.
- 10.- Producto alimenticio~~Alquernat Nebsui~~, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la aliína está contenida en un extracto de *Allium sativum*.
- 11.- Producto alimenticio~~Alquernat Nebsui~~, según la reivindicación 10, en el que la aliína está presente en dicho extracto en un porcentaje en peso entre el 20 y el 26 % en peso.
- 12.- Producto alimenticio~~Alquernat Nebsui~~, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el carvacrol está contenido en un extracto de *Origanum vulgare*.

13.- Producto alimenticio~~Alquernat Nebsui~~, según la reivindicación 12, en el que el carvacrol está presente en dicho extracto en un porcentaje en peso entre el 12 y el 15 % en peso.

14.- Procedimiento para la obtención de un producto alimenticio~~Alquernat Nebsui~~ para animales que comprende ácido elágico, p-cimenol, aliína y carvacrol, que comprende las etapas de:

- (a) obtener un extracto de ácido elágico de la cáscara de *Punica granatum*;
- (b) obtener un extracto de p-~~p~~-cimenol de las hojas de *Thymus vulgaris*;
- (c) obtener un extracto de aliína del bulbo de *Allium sativum*;
- (d) obtener un extracto de carvacrol a partir de las hojas de *Origanum vulgare*, donde dicho extracto de carvacrol tiene un porcentaje entre el 12 y el 15 % en peso de carvacrol;
- (e) mezclar los extractos de las etapas (a), (b) y (c) hasta homogeneidad.

15.- Procedimiento, según la reivindicación 14, en el que la etapa (a) comprende las siguientes subetapas:

- (a1) prensar y molturar las cáscaras de *Punica granatum* para obtener un producto con concentración entre el 6 y el 8% en peso de ácido elágico;
- (a2) macerar este polvo con ácido clorhídrico metanólico durante ~~aproximadamente~~ 30 horas a ~~aproximadamente~~ 70°C;
- (a3) evaporar el disolvente manteniendo la misma temperatura;
- (a4) añadir agua y centrifugar.
- (a5) descartar fase acuosa.

16.- Procedimiento, según la reivindicación 15, en el que en la etapa (a1) la concentración de ácido elágico es del 6% en peso e independientemente en la etapa (a4) se centrifuga a 6000 rpm durante 30 minutos.

17.- Procedimiento, según la reivindicación 14, en el que la etapa (b) comprende las siguientes subetapas:

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

18.- Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en el que la etapa (c) comprende las siguientes subetapas:

- (c1) suspender los dientes de *Allium sativum* en aceites vegetales a presión negativa y moler;

(c2) filtrar para separar las pieles

(c3) dejar reposar y decantar ~~aproximadamente~~ la mitad del volumen de la fase oleosa;

(c4) añadir una solución acuosa de ácido cítrico 0,5-1,5 mM;

(c5) tratar con p-hidroxibenzoato de etilo en proporción 1:5 y un emulsionante;

(c6) homogeneizar entre 30-35 minutos;

(c7) utilizar una absorber con bentonita ~~para absorber~~ la fase líquida y obtener el extracto en polvo.

19.- Procedimiento, según la reivindicación 15, en el que en la etapa (c1) el aceite vegetal es aceite de girasol e independientemente en la etapa (c4) la solución acuosa de ácido cítrico tiene una concentración de 1 mM.

20.- Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, en el que la etapa (d) comprende las siguientes subetapas:

(d1) molturar y secar las hojas de *Origanum vulgare* para obtener un producto en polvo;

(d2) macerar el polvo obtenido en (a1) en etanol, preferiblemente, durante 4 horas;

(d3) solidificar la oleorresina obtenida en (a2) por absorción con gel de sílice y evaporar el disolvente, preferiblemente, manteniendo la misma temperatura

(d4) centrifugar, preferiblemente, se centrífuga a 6000 rpm durante 30 minutos;

(d5) descartar fase acuosa.

REIVINDICACIONES

1.- Producto alimenticio para animales que comprende ácido elágico, p-cimenol, aliína y carvacrol, en el que el carvacrol está presente en un extracto en un porcentaje en peso entre el 12 y el 15 % en peso de dicho extracto.

2.- Producto alimenticio, según la reivindicación 1, en el que el ácido elágico está presente en un mínimo del 2,25% en peso en dicho producto.

3.- Producto alimenticio, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el p-cimenol está presente en un mínimo del 3,5% en peso en dicho producto.

4.- Producto alimenticio, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la aliína está presente en un mínimo del 5,5 % en peso en dicho producto.

5.- Producto alimenticio, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el carvacrol está presente en un mínimo del 2.4 % en peso en dicho producto.

6.- Producto alimenticio, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el ácido elágico está contenido en harina de *Punica granatum*.

7.- Producto alimenticio, según la reivindicación 6, en el que el ácido elágico está presente en la harina de *Punica granatum* en un porcentaje en peso entre el 2 y el 4 % en peso.

8.- Producto alimenticio, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el p-cimenol está contenido en un extracto de *Thymus vulgaris*.

9.- Producto alimenticio, según la reivindicación 8, en el que el p-cimenol está presente en dicho extracto en un porcentaje en peso entre el 15 y el 17 % en peso.

10.- Producto alimenticio, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la aliína está contenida en un extracto de *Allium sativum*.

11.- Producto alimenticio, según la reivindicación 10, en el que la aliína está presente en dicho extracto en un porcentaje en peso entre el 20 y el 26 % en peso.

12.- Producto alimenticio, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el carvacrol está contenido en un extracto de *Origanum vulgare*.

13.- Producto alimenticio, según la reivindicación 12, en el que el carvacrol está presente en dicho extracto en un porcentaje en peso entre el 12 y el 15 % en peso.

14.- Procedimiento para la obtención de un producto alimenticio para animales que comprende ácido elágico, p-cimenol, aliína y carvacrol, que comprende las etapas de:

- (a) obtener un extracto de ácido elágico de la cáscara de *Punica granatum*;
- (b) obtener un extracto de p- cimenol de las hojas de *Thymus vulgaris*;
- (c) obtener un extracto de aliína del bulbo de *Allium sativum*;
- (d) obtener un extracto de carvacrol a partir de las hojas de *Origanum vulgare*, donde dicho extracto de carvacrol tiene un porcentaje entre el 12 y el 15 % en peso de carvacrol;
- (e) mezclar los extractos de las etapas (a), (b) y (c) hasta homogeneidad.

15.- Procedimiento, según la reivindicación 14, en el que la etapa (a) comprende las siguientes subetapas:

- (a1) prensar y molturar las cáscaras de *Punica granatum* para obtener un producto con concentración entre el 6 y el 8% en peso de ácido elágico;
- (a2) macerar este polvo con ácido clorhídrico metanólico durante 30 horas a 70°C;
- (a3) evaporar el disolvente manteniendo la misma temperatura;
- (a4) añadir agua y centrifugar.
- (a5) descartar fase acuosa.

16.- Procedimiento, según la reivindicación 15, en el que en la etapa (a1) la concentración de ácido elágico es del 6% en peso e independientemente en la etapa (a4) se centrifuga a 6000 rpm durante 30 minutos.

17.- Procedimiento, según la reivindicación 14, en el que la etapa (b) comprende las siguientes subetapas:

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

18.- Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en el que la etapa (c) comprende las siguientes subetapas:

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

19.- Procedimiento, según la reivindicación 15, en el que en la etapa (c1) el aceite vegetal es aceite de girasol e independientemente en la etapa (c4) la solución acuosa de ácido cítrico tiene una concentración de 1 mM.

20.- Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, en el que la etapa (d) comprende las siguientes subetapas:

- (d1) molturar y secar las hojas de *Origanum vulgare* para obtener un producto en polvo;
- (d2) macerar el polvo obtenido en (a1) en etanol, preferiblemente, durante 4 horas;
- (d3) solidificar la oleorresina obtenida en (a2) por absorción con gel de sílice y evaporar el disolvente, preferiblemente, manteniendo la misma temperatura
- (d4) centrifugar, preferiblemente, se centrífuga a 6000 rpm durante 30 minutos;
- (d5) descartar fase acuosa.

DESCRIPCIÓN

PRODUCTO ALIMENTICIO ~~ALQUERNAT NEBSUI~~ PARA ANIMALES QUE COMPRENDE ÁCIDO ELÁGICO, P-CIMENOL, ALÍINA Y CARVACROL, Y PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la alimentación en animales. En particular, se refiere al producto alimenticio ~~Alquernat Nebsui~~ para animales que comprende ácido elágico, p-cimenol, alíina y carvacrol, y el procedimiento de obtención.

Antecedentes de la invención

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

La presente invención proporciona un producto novedoso con un contenido en sus principios activos que estimula fisiológicamente la síntesis de proteínas específicas de los enterocitos, mejorando la regeneración de la mucosa digestiva y, por consiguiente, la digestión de los alimentos y la absorción de los nutrientes.

Asimismo, el producto alimenticio ~~Alquernat Nebsui~~ permite un mayor control de los microorganismos patógenos en el intestino, de manera que disminuye la incidencia de enfermedades clínicas y subclínicas. El control de los microorganismos se traduce en una mejora del equilibrio de la flora intestinal, mediante la estimulación del crecimiento de *Lactobacillus*.

Los presentes inventores han obtenido un producto a partir de extractos vegetales cuya combinación sorprendentemente se ha visto que es óptima para la salud intestinal de los animales. (véase también las figuras 1 y 2)

La asociación de los cuatro principios activos de la presente invención ~~Alquernat Nebsui~~ (ácido elágico, p-cimenol, aliína y carvacrol) permite obtener un producto final con gran capacidad de interacción genómica para la regeneración de las células epiteliales del intestino (véase también las figuras 3 y 4).

En último término, mejora sorprendentemente la productividad de las explotaciones; ya que se mejora el índice de conversión de los animales (relación existente entre el peso ganado por el animal y el alimento consumido) al mejorarse su bienestar digestivo.

Adicionalmente, los presentes inventores han desarrollado un procedimiento para la obtención de un producto alimenticio ~~Alquernat Nebsui~~ que permite obtener un producto en polvo de fácil conservación y administración; y a su vez, con los contenidos nutricionales de un producto fresco.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Macroscopía del intestino sin el uso de l producto de la invención ~~A. Nebsui~~. Inflamación, necrosis y contenido fluido.

Figura 2: Macroscopía del intestino con el uso de l producto de la invención ~~A. Nebsui~~. Buen estado de la mucosa, buena integridad, sin inflamación ni necrosis.

Figura 3: Microscopía de las células epiteliales del intestino sin el uso de l producto de la invención ~~A. Nebsui~~.

Figura 4: Microscopía de las células epiteliales del intestino con el uso de l producto de la invención ~~A. Nebsui~~.

Figura 5: Alimento consumido (g) por repetición para los lotes T1, T2 y T3, según el ejemplo 6.1.

Figura 6: Promedio de alimento consumido (g) para los lotes T1, T2 y T3, según el ejemplo 6.1.

Figura 7: Ganancia de peso semanal (g) para los lotes T1, T2 y T3, según el ejemplo 6.1.

Figura 8: Ganancia de peso final (kg) para los lotes T1, T2 y T3, según el ejemplo 6.1.

Figura 9: Índice de conversión alimenticia (ICA) por repetición para los lotes T1, T2 y T3, según el ejemplo 6.1.

Figura 10: Promedio del índice de conversión alimenticia (ICA) para los lotes T1, T2 y T3, según el ejemplo 6.1.

Figura 11: Índice de conversión alimenticia (%), tomando el ICA del grupo control como el 100%, para los lotes T1, T2 y T3, según el ejemplo 6.1.

Figura 12: Índice de eficiencia productivo europeo (IEPE) por repetición para los lotes T1, T2 y T3, según el ejemplo 6.1.

5 Figura 13: Índice de eficiencia productivo europeo (IEPE) para los lotes T1, T2 y T3, según el ejemplo 6.1.

Figura 14: Relación entre el peso del intestino y el peso vivo del animal para los lotes T1, T2 y T3, según el ejemplo 6.1.

10 Figura 15: Microscopía de íleo, yeyuno y duodeno sin el uso de l producto alimenticio A- Nebsui y con el uso de l producto alimenticio A- Nebsui, según el ejemplo 6.2.

Figura 16: Efecto de l producto alimenticio A- Nebsui sobre la flora intestinal bacteriana al día 60 para los lotes T1 y T3, según el ejemplo 6.2.

Descripción resumida de la invención

15

Un primer objetivo de la invención es un el producto alimenticio Alquernat Nebsui para animales que comprende ácido elágico, p-cimenol, aliína y carvacrol.

20

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

Descripción de la invención

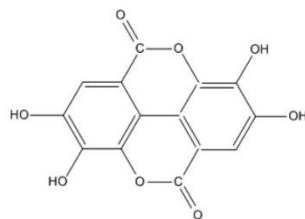
25

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

30

En una realización preferida, el **ácido elágico** está presente en un como mínimo del 2.25 % en peso en el producto alimenticio Alquernat Nebsui. Dicho ácido elágico está contenido preferiblemente en harina de *Punica granatum*, más preferiblemente está contenido en un porcentaje en peso entre el 2 y el 4 % en peso.

35

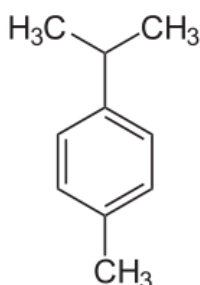


Ácido elágico

El ácido elágico es un polifenol que tiene efecto completo y potente sobre el control de radicales libres que permite proteger eficazmente a los tejidos de los efectos del estrés oxidativo y además presenta un efecto antimicrobiano y antiparasitario.

En otra realización preferida, el **p-cimenol** está presente en un como mínimo del 3,5% en peso en el producto— alimenticio ~~Alquernat Nebsui~~. Dicho p-cimenol está contenido preferiblemente en un extracto de *Thymus vulgaris*, más preferiblemente está contenido en un porcentaje en peso entre el 15 y el 17 % en peso.

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



p-cimenol

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

Mecanismo de acción en bacterias

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

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

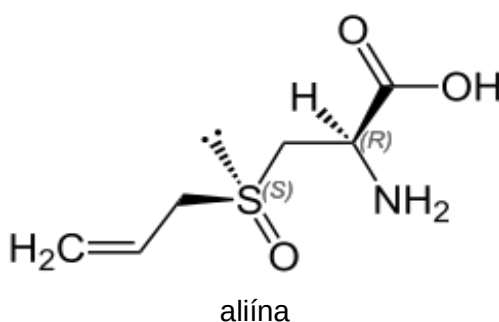
5

Mecanismo de acción en levaduras y hongos

10 Sobre levaduras y hongos, concentraciones adecuadas de anillo p-cimenol consiguen eliminar el 100% de microorganismos en tan solo 10 minutos de contacto. Se observa lisis de las células y liberación del contenido celular al medio. Al microscopio electrónico, levaduras y hongos presentan deformidades y fracturas en las paredes celulares, sobretodo los que se encuentran en la fase de proliferación.

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

20 En aún otra realización preferida, la aliína está presente en un como mínimo de 5,5% en peso en el producto- alimenticio Alquernat Nebsui. Dicha aliína está contenida en un extracto de *Allium sativum*, más preferiblemente está contenida en un porcentaje en peso entre el 20 y el 26 % en peso.



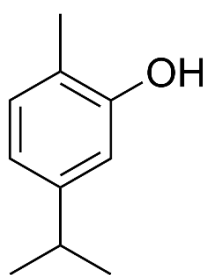
25

El bulbo subterráneo de *Allium sativum* (comúnmente ajo) contiene numerosos componentes activos, entre los que destacan los compuestos azufrados. Si el bulbo está intacto y fresco el compuesto mayoritario es el sulfóxido de S-alil-cisteína o Aliína. Este es un compuesto inestable que se hidroliza por acción de la enzima Aliínasa que también está presente en el bulbo. Se obtiene la Alicina. Dicha alicina a su vez también es un compuesto elevadamente volátil. La aliína está presente en el citosol, que también es el sustrato de la

30

enzima aliínasa que se encuentra en vacuolas separadas. Cuando el ajo es machacado, las vacuolas que contienen la enzima se rompen y tiene lugar la reacción con la aliína para formar un producto intermedio que condensa para dar la alicina.

En otra realización preferida, el **carvacrol** está presente en un como mínimo del 2.4 % en peso en el producto alimenticio ~~Alquernat Nebsui~~. Dicho carvacrol está contenido preferiblemente en harina de *Origanum vulgare*, más preferiblemente está contenido en un porcentaje en peso entre el 12 y el 15 % en peso.



carvacrol

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

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

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

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

(a1) prensar y molturar las cáscaras de *Punica granatum* para obtener un producto ecológico con concentración entre el 6 y el 8 % en peso de ácido elágico, preferiblemente el 6 % en peso de ácido elágico;

5 (a2) macerar el polvo obtenido en (a1) con ácido clorhídrico metanólico durante ~~aproximadamente~~ 30 horas a ~~aproximadamente~~ 70°C. El envase está herméticamente cerrado;

(a3) evaporar el disolvente manteniendo la misma temperatura. Habitualmente se realiza destapando el envase;

10 (a4) añadir agua y centrifugar. Preferiblemente, se centrifuga a 6000 rpm durante 30 minutos.

(a5) descartar fase acuosa.

De este modo se obtiene el extracto de ácido elágico.

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

(b1) prensar en frío las hojas de *Thymus vulgaris*;

(b2) suspender en agua el extracto obtenido en (b1);

(b3) destilar el aceite del extracto de las hojas;

(b4) extraer el aceite de la fase acuosa;

20 (b5) extraer con una base el contenido fenólico del aceite y solubilizarlo en agua;

(b6) extraer el p-cimenol con éter;

(b7) evaporar el éter.

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

25

Preferiblemente, la etapa (c) comprende las siguientes subetapas y no requiere de ninguna etapa de hidrólisis:

(c1) suspender los dientes de *Allium sativum* en aceites vegetales, preferiblemente aceite de girasol a presión negativa y moler;

30 (c2) filtrar para separar las pieles;

(c3) dejar reposar y decantar ~~aproximadamente~~ la mitad del volumen de la fase oleosa;

(c4) añadir una solución acuosa de ácido cítrico 0,5-1,5 mM, preferiblemente 1 mM;

(c5) tratar con p-hidroxibenzoato de etilo en proporción 1:5 y un emulsionante;

(c6) homogeneizar entre 30-35 minutos;

35 (c7) utilizar una bentonita para absorber la fase líquida y obtener el extracto de aliína en polvo.

Mediante esta etapa (c) se obtiene un extracto de *Allium sativum* que conserva intacto el contenido de aliína y alinasa, de manera que el proceso bioquímico de conversión de aliína en sus derivados se produce al entrar el producto en contacto con la saliva, cuyas condiciones son las idóneas para la activación de la enzima para la hidrólisis de aliínasa; de manera que los beneficios de los pronutrientes contenidos en *Allium sativum* son máximos, ya que la concentración de los mismos equivaldría a ingerirlo en crudo sin pérdidas.

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

- (d1) molturar y secar las hojas de *Origanum vulgare* para obtener un producto en polvo;
- (d2) macerar el polvo obtenido en (a1) en etanol, preferiblemente, durante 4 horas;
- (d3) solidificar la oleorresina obtenida en (a2) por absorción con gel de sílice y evaporar el disolvente, preferiblemente, manteniendo la misma temperatura
- (d4) centrifugar, preferiblemente, se centrífuga a 6000 rpm durante 30 minutos;
- (d5) descartar fase acuosa.

De este modo se obtiene el extracto de carvacrol.

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

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Obtención de ácido elágico a partir de *Punica granatum*

Se realizó un primer prensado de las cáscaras de *Punica granatum* para la obtención de la parte polvo que contiene ácido elágico en una concentración del ~~aproximadamente~~ 6 %. Este extracto podría considerarse ecológico al no tener ningún tipo de tratamiento químico.

Para obtener ácido elágico más concentrado, se maceró en ácido clorhídrico metanólico (que se obtiene adicionando 0,190 L de cloruro de acetilo al 98 % por cada litro de metanol).

La proporción por cada kilo de cáscara prensada de *Punica granatum* es de 4 litros de ácido clorhídrico metanólico. Esta parte del proceso se llevó a cabo en un congelador y

posteriormente se llevó la suspensión tapada a 70°C durante 30 horas. Posteriormente se destapó y se evaporaron los disolventes.

5 Una vez sólo queda el residuo seco, se añadió agua al mismo y se centrifugó a 6000 rpm durante 30 minutos, de manera que se eliminan los compuestos hidrosolubles por descarte de la fase acuosa.

Este método de extracción consigue más del doble de la cantidad de ácido elágico (15,4 %) en el extracto con respecto a la extracción con los métodos habituales que se realizan
10 con ácido sulfúrico 2 N (6,1 %).

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

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

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

Por ello, para la extracción del aceite esencial de tomillo se usó una destilación con arrastre de vapor. Debido a la volatilidad y la insolubilidad del aceite en agua se esperará que el
25 producto presente dos fases. Posteriormente se hizo una extracción para separar el aceite esencial puro con un embudo de separación. Se separó el aceite esencial en un recipiente tapado y protegido de la luz para evitar la descomposición lumínica.

Con la parte acuosa se realizó una nueva extracción con éter para lograr así separar
30 finalmente los excedentes de aceite que queden solubilizados en esta fase. De la fase etérea se extrajeron las trazas de agua remanente con sulfato de sodio como desecante. Para reducir la cantidad de componentes a separar mediante cromatografía se realizó una extracción ácido-base.

35

Para la obtención de los fenoles, entre los cuales el p-cimenol, que son los compuestos de mayor acidez en el aceite esencial, se realizó una extracción ácido-base. En primer lugar, se colocó en el embudo de separación los aceites obtenidos junto con agua destilada. A continuación, se añadieron 50 ml de hidróxido de potasio 1N haciendo que los fenoles, por ser los compuestos más ácidos presentes en aceite, sean solubles en la fase acuosa. Una vez aislada la fase acuosa del resto se llevó a un nuevo embudo de separación para su acidificación con 15 ml ácido clorhídrico 2N y se agregaron 100 ml de éter. De esta manera se obtuvieron solamente los fenoles en fase etérea.

Se juntaron todas las fases etéreas y se filtraron con sulfato de sodio anhidro como desecante para eliminar las trazas de agua. Posteriormente se llevó el compuesto a calentar en baño maría para evaporar el éter y obtener así los fenoles aislados. Este aceite es absorbido con una bentonita, lo que permite tener el producto en un polvo fino con entre un 14 y un 16 % de p-cimenol. Se llevó a cabo una estandarización del extracto para comprobar la pureza y riqueza del mismo.

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

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

Para incrementar la concentración de aliína a partir de esta emulsión se realizó una concentración de aliína. Para ello, se dejó reposar durante 2 horas y se decantó la parte oleosa reduciendo su volumen a la mitad. Se añadió una solución acuosa de ácido cítrico 1 mM y se trató la emulsión restante con p-hidroxibenzoato de etilo en una proporción de 1:5 y un emulsionante y se homogeneizó durante 30 minutos. De este modo, se obtuvo un extracto de *Allium sativum* con una riqueza de aliína de entre el 20 y el 26 %.

Ejemplo 4. Obtención de carvacrol a partir de las hojas de *Origanum vulgare*

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

Se maceraron 100 kilos de polvo seco de hojas de *Origanum vulgare* con etanol al 96 % en una proporción 1:3 p/v durante 4 horas. Se obtuvo un producto con la consistencia de una oleorresina que es necesario absorber con gel de sílice y procesar en el rotavapor a 6000 rpm durante 30 min.

100 kilos de producto en polvo tienen un rendimiento de 12 kg de extracto rico de carvacrol (12 – 15 %). Se llevó a cabo una estandarización del extracto para comprobar la pureza y riqueza del mismo.

Ejemplo 5. Obtención del ~~producto alimenticio-Alquernat Nebsui~~.

Una vez todos los principios activos han sido purificados, previo análisis cuantitativo para comprobar las concentraciones, se llevó a cabo la preparación del producto final. Esta preparación tuvo lugar por mezcla simple de los extractos para obtener el producto en forma de líquido.

Para la preparación del ~~producto alimenticio-Alquernat Nebsui~~ en polvo, se realizó un paso previo de absorción de la solución oleosa de extracto de *Allium sativum*. Se absorbió con ~~utilizó~~ una bentonita de granulometría 74 µm ~~para absorber~~ la solución oleosa en una proporción de 5 litros por kilo de bentonita.

En este reactor se introdujeron 25 kilos de harina de *Punica granatum*, 25 kilos de harina de *Thymus vulgaris*, 50 kilos de harina de *Allium sativum* y 25 kg de harina de *Origanum vulgare*. Se mezclaron durante 6 minutos, momento en que se puede asegurar la homogeneidad del producto. En este momento se realizó una molturación del producto, para garantizar una granulometría apropiada para el uso en instalaciones industriales, que serán los usuarios finales del producto. El alimento obtenido por la incorporación de ingredientes naturales de plantas aromáticas, está listo para ser consumido con una composición mínima garantizada de 2,25 % en peso de ácido elágico, 3,5 % en peso de p-cimenol, 5,5 % en peso de aliína y 2,4 % en peso de carvacrol.

Ejemplo 6. Tests de eficacia

Para demostrar la eficacia de l producto de la invención Alquernat Nebsui sobre el intestino y frente a la presencia de patógenos, se han realizado varios test, que comparan el uso del producto de invención frente a los antibióticos promotores del crecimiento.

Ejemplo 6.1. El primer ensayo se realizó en Perú y se evaluaron los parámetros productivos en pollos de engorde suplementados con el producto alimenticioA. Nebsui frente a un antibiótico promotor del crecimiento. Se evaluó el índice de conversión alimenticia y el efecto del producto de invención sobre el peso relativo intestinal.

Diseño experimental:

Duración: desde el día 0 al sacrificio (42 días)

Número de lotes: 3

Número animales/lotes: 100 animales/lote

Número de réplicas/lote: 10 réplicas/lote

Número totales de animales: 300

Aptitud productiva: broilers

Estirpe: Cobb Vantress 500

Tratamientos:

- Tratamiento 1, T1 (Control): sólo alimento formulado. 10 grupos de 10 animales
- Tratamiento 2, T2 (Producto alimenticioA. Nebsui): alimento formulado + Producto alimenticioAlquernat Nebsui. 10 grupos de 10 animales.
- Tratamiento 3, T3 (APC): alimento formulado + bacitracina metileno disalicilato. 10 grupos de 10 animales.

Resultados:

Tabla 1: Alimento consumido en gramos por repetición para cada tratamiento, (véase también figuras 5 y 6)

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	PROMEDIO
T1	46630	50275	46843	46830	52320	52943	49030	52620	46680	49965	49413.6
T2	49125	51345	50205	46064	47150	44985	45375	52510	47770	53330	48785.9
T3	53310	52405	54085	53370	47356	53025	54455	48235	49325	45720	51128.6

Se observa que el grupo de tratamiento que tuvo un menor consumo de alimento fue el tratamiento T2, que contaba con el producto alimenticio A. Nebsui.

Tabla 2: Ganancia de peso semanal por tratamiento en gramos, (véase también figuras 7 y 8)

SEMANA	0	1	2	3	4	5	6	TOTAL
T1	47.73	198.44	489.61	918.68	1545.08	2216.24	2701.12	2.70
T2	47.58	198.55	496.01	933.38	1586.61	2292.73	2782.61	2.78
T3	47.23	199.91	499.21	936.70	1595.24	2312.68	2813.61	2.81

Se observa que los tratamientos T2 y T3 lograron una mayor ganancia de peso en comparación del control.

10 Tabla 3: ICA por repetición para cada tratamiento, (véase también figuras 9, 10 y 11)

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	PROMEDIO
T1	1.69	1.64	1.63	1.58	1.60	1.63	1.60	1.60	1.57	1.54	1.61
T2	1.53	1.53	1.54	1.45	1.61	1.59	1.56	1.55	1.61	1.61	1.56
T3	1.60	1.55	1.56	1.59	1.55	1.60	1.57	1.63	1.58	1.60	1.58

Índice de conversión alimenticia (ICA): cantidad de alimento requerido para producir un kilogramo de peso vivo de pollo.

15 El tratamiento T2 que contaba con el producto alimenticio A. Nebsui presentó un mejor índice de conversión alimenticia.

Tabla 4: IEPE por repetición para cada tratamiento, (véase también figuras 12 y 13)

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	PROMEDIO
T1	347.04	385.74	366.18	391.06	422.02	391.68	398.22	428.13	354.65	394.94	387.97
T2	421.79	395.80	441.34	407.18	375.27	366.90	385.15	456.23	382.40	389.92	402.20
T3	429.76	453.75	412.94	437.21	367.05	430.72	456.96	376.18	407.18	370.99	414.27

20 Índice de eficiencia productiva europeo (IEPE):

$$\text{IEPE} = \frac{\text{Viabilidad (\%)} \times \text{Peso (kg)}}{\text{ICA} \times \text{días de engorde}} \times 100$$

El tratamiento T3 presenta un mejor factor de IEPE

Se pudo obtener que el lote con el producto alimenticio~~A. Nebsui~~ obtuvo un peso intestinal relativamente menor en comparación con los otros tratamientos (véase también figura 14).

Conclusiones:

5

El producto alimenticio~~Alquernat Nebsui~~ consigue reducir el índice de conversión de manera significativa en animales que no se encuentran frente un reto marcado.

- El producto alimenticio~~A. Nebsui~~ mejora el ICA un 3.11 %, en comparación con el lote control T1.
- 10 - El antibiótico promotor del crecimiento mejora el ICA un 1.86 %, en comparación el lote control T1.

Tanto el producto alimenticio~~A. Nebsui~~ como el antibiótico promotor del crecimiento consiguen mejorar el índice de eficiencia (IEPE) sin diferencias significativas.

15

El producto alimenticio~~Alquernat Nebsui~~ consigue reducir el peso del intestino. Esto es un indicativo de una mejora de la eficiencia del órgano (↑ eficiencia, ↓ relativo) gracias al uso el producto alimenticio~~A. Nebsui~~ rico en extractos de plantas.

- 20 Tanto el producto alimenticio~~Alquernat Nebsui~~ como el antibiótico promotor de crecimiento mejoran la ganancia de peso sin diferencias significativas.

Ejemplo 6.2. El segundo ensayo se realizó en China y se evaluaron los parámetros productivos en cerdos destetados suplementados con el producto alimenticio ~~Alquernat Nebsui~~ frente a dos antibióticos promotores del crecimiento. Se evaluaron parámetros de crecimiento (peso corporal, ganancia de peso e índice de conversión), ratio de diarreas, el efecto del el producto alimenticio ~~Alquernat Nebsui~~ sobre la estructura del intestino y sobre la flora intestinal bacteriana.

30 Diseño experimental:

Animales: 90 lechones “Y x L” de 25 días de edad con paridad (3 – 6) y pesos parecidos. Todos los cerdos se dividieron en 3 lotes, 3 galpones por lote, 10 cerdos en cada galpón
Duración: 30 días

35

Tratamientos:

- Tratamiento 1, T1 (Control): dieta estándar.
- Tratamiento 2, T2 (APCs): dieta estándar + colistina (20 mg/kg) + bacitracina de zinc (100 mg/kg)
- Tratamiento 3, T3 (~~Producto alimenticio A. Nebsui~~): dieta estándar + ~~Producto alimenticio A. Nebsui~~ (400 mg/kg)

Parámetros evaluados y muestreo:

- Peso corporal días 30, 45 y 60
- Contenido intestinal y cecal, se tomaron muestras el día 60 de un cerdo/galpón.

Resultados:

Tabla 5: Parámetros productivos y ratio de diarrea los días 30-45

	T1	T2	T3
PESO DÍA 30 (kg)	8.28±0.01 ^{Aa}	8.27±0.03 ^{Aa}	8.27±0.06 ^{Aa}
PESO DÍA 45 (kg)	12.48±0.09 ^{Aa}	13.32±0.23 ^{Bb}	13.25±0.25 ^{BCbc}
GANANCIA PESO (g)	477.14±0.66 ^{Aa}	519.70±25.45 ^{Bb}	509.51±6.34 ^{ABb}
GMD (g)	279.36±6.10 ^{Aa}	336.78±15.03 ^{Bb}	332.10±14.45 ^{Bb}
IC	1.69±0.04 ^{Aa}	1.53±0.07 ^{Aa}	1.54±0.12 ^{Aa}
RATIO DIARREA	4.56±0.83 ^{Aa}	1.76±0.45 ^{Bb}	2.16±0.27 ^{Bb}

Tabla 6: Parámetros productivos y ratio de diarrea los días 45-60

	T1	T2	T3
PESO DÍA 45 (kg)	12.48±0.09 ^{Aa}	13.32±0.23 ^{Bb}	13.25±0.25 ^{BCbc}
PESO DÍA 60 (kg)	20.28±0.13 ^{Aa}	21.49±0.28 ^{Bb}	21.50±0.12 ^{Bb}
GANANCIA PESO (g)	939.94±10.09 ^{Aa}	1010.89±40.24 ^{ABb}	1015.22±17.85 ^{ABb}
GMD (g)	510.81±29.85 ^{Aa}	44.39±18.94 ^{Aab}	550.08±12.15 ^{Aab}
IC	1.85±0.08 ^{Aa}	1.85±0.03 ^{Aa}	1.86±0.04 ^{Aa}
RATIO DIARREA	3.27±0.74 ^{Aa}	1.12±0.36 ^{Bb}	1.63±0.55 ^{Bb}

Tabla 7: Parámetros productivos y ratio de diarrea los días 30-60

	T1	T2	T3
PESO DÍA 30 (kg)	8.28±0.01 ^{Aa}	8.27±0.03 ^{Aa}	8.27±0.06 ^{Aa}
PESO DÍA 60 (kg)	20.28±0.13 ^{Aa}	21.49±0.28 ^{Bb}	21.50±0.12 ^{Bb}
GANANCIA PESO (g)	705.54±4.72 ^{Aa}	764.35±33.35 ^{Ab}	762.37±11.01 ^{Ab}

GMD (g)	399.85±4.22 ^{Aa}	440.58±12.76 ^{Bb}	441.09±3.05 ^{Bb}
IC	1.77±0.04 ^{Aa}	1.73±0.03 ^{Aa}	1.73±0.05 ^{Aa}
RATIO DIARREA	2.87±0.52 ^{Aa}	0.92±0.35 ^{Bb}	1.22±0.45 ^{Bb}

Tabla 8: Efecto del producto de invención sobre la estructura del íleo al día 60

	T1	T2	T3
ALTURA VELLOSIDADES (µm)	321.45±48.00 ^{Aa}	415.44±94.44 ^{Bb}	388.25±52.97 ^{ABb}
PROFUNDIDAD CRIPTAS (µm)	156.96±58.59 ^{Aa}	168.76±21.45 ^{Aa}	120.37±22.26 ^{Ab}
ALTURA VELLOS./PROF. CRIPTAS	2.31±0.74 ^{Aa}	2.46±0.78 ^{Aab}	3.23±0.53 ^{ABc}

Tabla 9: Efecto del producto de invención sobre la estructura del yeyuno al día 60

	T1	T2	T3
ALTURA VELLOSIDADES (µm)	391.34±65.15 ^{Aa}	396.46±81.04 ^{Aa}	399.59±45.62 ^{Aa}
PROFUNDIDAD CRIPTAS (µm)	139.37±33.95 ^{Aa}	137.65±21.20 ^{Aa}	124.32±26.84 ^{Aa}
ALTURA VELLOS./PROF. CRIPTAS	2.09±0.16 ^{ABa}	1.98±0.22 ^{Aa}	3.21±0.73 ^{BCb}

5

Tabla 10: Efecto del producto de invención sobre la estructura del duodeno al día 60

	T1	T2	T3
ALTURA VELLOSIDADES (µm)	307.88±47.28 ^{Aa}	346.40±78.69 ^{ACa}	462.43±29.71 ^{Bb}
PROFUNDIDAD CRIPTAS (µm)	144.43±43.24 ^{Aa}	142.72±19.17 ^{Aa}	138.94±18.99 ^{Aa}
ALTURA VELLOS./PROF. CRIPTAS	2.35±0.50 ^{Aa}	2.36±0.25 ^{ABab}	3.33±0.35 ^{ABb}

10 El producto alimenticio ~~A. Nebsui~~ tiene un efecto positivo sobre la estructura del intestino (íleo, yeyuno y duodeno). El uso del ~~producto alimenticio A. Nebsui~~ aumenta la superficie de absorción e integridad del intestino (véase también la figura 15).

15 El producto alimenticio ~~A. Nebsui~~ tiene un efecto positivo sobre la flora intestinal bacteriana. El uso del ~~producto alimenticio A. Nebsui~~ produce una estimulación del crecimiento de *Lactobacillus* y reduce *E. coli* (véase también la figura 16).

Conclusiones:

20 El producto alimenticio ~~Alquernat Nebsui~~ mejoró los parámetros de crecimiento de los lechones destetados, obteniendo unos resultados similares a los del uso de los antibióticos.

El producto alimenticio ~~Alquernat Nebsui~~ disminuyó el % de diarreas, obteniendo unos resultados similares a los del uso de los antibióticos.

| El producto alimenticio ~~Alquernat-Nebui~~ mejoró la estructura de las vellosidades intestinales (íleo, yeyuno, ciego), mientras que los antibióticos promotores del crecimiento no tuvieron dicho efecto.

- | 5 El producto alimenticio ~~Alquernat-Nebui~~ mejoró el equilibrio de la flora intestinal: más *Lactobacillus* y menos *E. coli* en comparación con el grupo control.

DESCRIPCIÓN

PRODUCTO ALIMENTICIO PARA ANIMALES QUE COMPRENDE ÁCIDO ELÁGICO, P-CIMENOL, ALÍINA Y CARVACROL, Y PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la alimentación en animales. En particular, se refiere al producto alimenticio para animales que comprende ácido elágico, p-cimenol, aliína y carvacrol, y el procedimiento de obtención.

10

Antecedentes de la invención

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

20

La presente invención proporciona un producto novedoso con un contenido en sus principios activos que estimula fisiológicamente la síntesis de proteínas específicas de los enterocitos, mejorando la regeneración de la mucosa digestiva y, por consiguiente, la digestión de los alimentos y la absorción de los nutrientes.

25

Asimismo, el producto alimenticio permite un mayor control de los microorganismos patógenos en el intestino, de manera que disminuye la incidencia de enfermedades clínicas y subclínicas. El control de los microorganismos se traduce en una mejora del equilibrio de la flora intestinal, mediante la estimulación del crecimiento de *Lactobacillus*.

30

Los presentes inventores han obtenido un producto a partir de extractos vegetales cuya combinación sorprendentemente se ha visto que es óptima para la salud intestinal de los animales. (véase también las figuras 1 y 2)

La asociación de los cuatro principios activos de la presente invención (ácido elágico, p-cimenol, aliína y carvacrol) permite obtener un producto final con gran capacidad de

35

interacción genómica para la regeneración de las células epiteliales del intestino (véase también las figuras 3 y 4).

5 En último término, mejora sorprendentemente la productividad de las explotaciones; ya que se mejora el índice de conversión de los animales (relación existente entre el peso ganado por el animal y el alimento consumido) al mejorarse su bienestar digestivo.

Adicionalmente, los presentes inventores han desarrollado un procedimiento para la obtención de un producto alimenticio que permite obtener un producto en polvo de fácil
10 conservación y administración; y a su vez, con los contenidos nutricionales de un producto fresco.

Breve descripción de los dibujos

15 Figura 1: Macroscopía del intestino sin el uso del producto de la invención. Inflamación, necrosis y contenido fluido.

Figura 2: Macroscopía del intestino con el uso del producto de la invención. Buen estado de la mucosa, buena integridad, sin inflamación ni necrosis.

Figura 3: Microscopía de las células epiteliales del intestino sin el uso del producto de la
20 invención.

Figura 4: Microscopía de las células epiteliales del intestino con el uso del producto de la invención.

Figura 5: Alimento consumido (g) por repetición para los lotes T1, T2 y T3, según el ejemplo 6.1.

25 Figura 6: Promedio de alimento consumido (g) para los lotes T1, T2 y T3, según el ejemplo 6.1.

Figura 7: Ganancia de peso semanal (g) para los lotes T1, T2 y T3, según el ejemplo 6.1.

Figura 8: Ganancia de peso final (kg) para los lotes T1, T2 y T3, según el ejemplo 6.1.

Figura 9: Índice de conversión alimenticia (ICA) por repetición para los lotes T1, T2 y T3,
30 según el ejemplo 6.1.

Figura 10: Promedio del índice de conversión alimenticia (ICA) para los lotes T1, T2 y T3, según el ejemplo 6.1.

Figura 11: Índice de conversión alimenticia (%), tomando el ICA del grupo control como el 100%, para los lotes T1, T2 y T3, según el ejemplo 6.1.

35 Figura 12: Índice de eficiencia productivo europeo (IEPE) por repetición para los lotes T1, T2 y T3, según el ejemplo 6.1.

Figura 13: Índice de eficiencia productivo europeo (IEPE) para los lotes T1, T2 y T3, según el ejemplo 6.1.

Figura 14: Relación entre el peso del intestino y el peso vivo del animal para los lotes T1, T2 y T3, según el ejemplo 6.1.

- 5 Figura 15: Microscopía de íleo, yeyuno y duodeno sin el uso del producto alimenticio y con el uso del producto alimenticio, según el ejemplo 6.2.

Figura 16: Efecto del producto alimenticio sobre la flora intestinal bacteriana al día 60 para los lotes T1 y T3, según el ejemplo 6.2.

10 **Descripción resumida de la invención**

Un primer objetivo de la invención es un producto alimenticio para animales que comprende ácido elágico, p-cimenol, alíina y carvacrol.

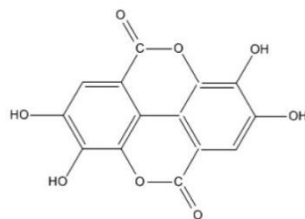
- 15 Un segundo objetivo de la invención se refiere a un procedimiento para la obtención del producto alimenticio según el primer aspecto de la invención.

Descripción de la invención

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

- 25 En una realización preferida, el **ácido elágico** está presente en un mínimo del 2.25 % en peso en el producto alimenticio. Dicho ácido elágico está contenido preferiblemente en harina de *Punica granatum*, más preferiblemente está contenido en un porcentaje en peso entre el 2 y el 4 % en peso.

30

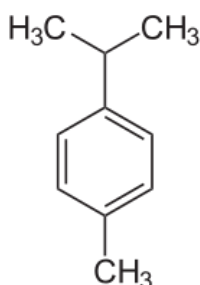


Ácido elágico

El ácido elágico es un polifenol que tiene efecto completo y potente sobre el control de radicales libres que permite proteger eficazmente a los tejidos de los efectos del estrés oxidativo y además presenta un efecto antimicrobiano y antiparasitario.

En otra realización preferida, el **p-cimenol** está presente en un mínimo del 3,5% en peso en el producto alimenticio. Dicho p-cimenol está contenido preferiblemente en un extracto de *Thymus vulgaris*, más preferiblemente está contenido en un porcentaje en peso entre el 15 y el 17 % en peso.

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



p-cimenol

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

Mecanismo de acción en bacterias

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

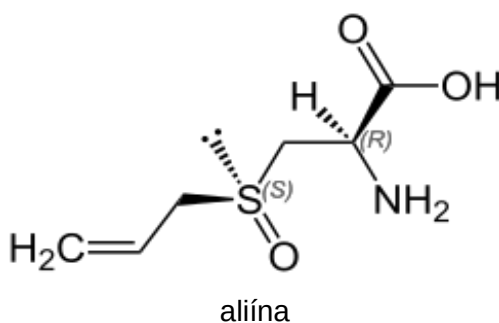
A nivel intracelular el anillo p-cimenol afecta las rutas biosintéticas del ATP (molécula imprescindible para el metabolismo energético), el pH celular y el equilibrio de los iones inorgánicos.

5 Mecanismo de acción en levaduras y hongos

Sobre levaduras y hongos, concentraciones adecuadas de anillo p-cimenol consiguen eliminar el 100% de microorganismos en tan solo 10 minutos de contacto. Se observa lisis de las células y liberación del contenido celular al medio. Al microscopio electrónico, levaduras y hongos presentan deformidades y fracturas en las paredes celulares, sobretodo los que se encuentran en la fase de proliferación.

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

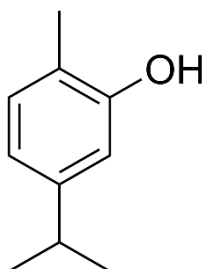
En aún otra realización preferida, la **aliína** está presente en un mínimo del 5,5% en peso en el producto alimenticio. Dicha aliína está contenida en un extracto de *Allium sativum*, más preferiblemente está contenida en un porcentaje en peso entre el 20 y el 26 % en peso.



El bulbo subterráneo de *Allium sativum* (comúnmente ajo) contiene numerosos componentes activos, entre los que destacan los compuestos azufrados. Si el bulbo está intacto y fresco el compuesto mayoritario es el sulfóxido de S-alil-cisteína o Aliína. Este es un compuesto inestable que se hidroliza por acción de la enzima Aliínasa que también está presente en el bulbo. Se obtiene la Alicina. Dicha alicina a su vez también es un compuesto elevadamente volátil. La aliína está presente en el citosol, que también es el sustrato de la enzima aliínasa que se encuentra en vacuolas separadas. Cuando el ajo es machacado,

las vacuolas que contienen la enzima se rompen y tiene lugar la reacción con la aliína para formar un producto intermedio que condensa para dar la alicina.

- 5 En otra realización preferida, el **carvacrol** está presente en un mínimo del 2.4 % en peso en el producto alimenticio. Dicho carvacrol está contenido preferiblemente en harina de *Origanum vulgare*, más preferiblemente está contenido en un porcentaje en peso entre el 12 y el 15 % en peso.



carvacrol

El carvacrol inhibe el crecimiento y elimina un elevado número de patógenos que producirían toxinas dañinas en el intestino. Algunos de estos patógenos se asocian con gastroenteritis, diarreas hemorrágicas, fallo renal, entre otros trastornos o enfermedades.

El carvacrol daña la integridad de la pared celular de estas bacterias. Es particularmente interesante indicar que el carvacrol tiene muy poca o escasa interacción con la flora probiótica del intestino. A concentraciones en que inhibe el crecimiento de bacterias patógenas entre el 97 y el 100 %, sólo afecta a las bacterias probióticas entre un 3 y un 5 %.

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

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

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

(a1) prensar y molturar las cáscaras de *Punica granatum* para obtener un producto ecológico con concentración entre el 6 y el 8 % en peso de ácido elágico, preferiblemente el 6 % en peso de ácido elágico;

5 (a2) macerar el polvo obtenido en (a1) con ácido clorhídrico metanólico durante 30 horas a 70°C. El envase está herméticamente cerrado;

(a3) evaporar el disolvente manteniendo la misma temperatura. Habitualmente se realiza destapando el envase;

(a4) añadir agua y centrifugar. Preferiblemente, se centrifuga a 6000 rpm durante 30 minutos.

10 (a5) descartar fase acuosa.

De este modo se obtiene el extracto de ácido elágico.

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

15 (b1) prensar en frío las hojas de *Thymus vulgaris*;

(b2) suspender en agua el extracto obtenido en (b1);

(b3) destilar el aceite del extracto de las hojas;

(b4) extraer el aceite de la fase acuosa;

(b5) extraer con una base el contenido fenólico del aceite y solubilizarlo en agua;

20 (b6) extraer el p-cimenol con éter;

(b7) evaporar el éter.

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

25 Preferiblemente, la etapa (c) comprende las siguientes subetapas y no requiere de ninguna etapa de hidrólisis:

(c1) suspender los dientes de *Allium sativum* en aceites vegetales, preferiblemente aceite de girasol a presión negativa y moler;

(c2) filtrar para separar las pieles;

30 (c3) dejar reposar y decantar la mitad del volumen de la fase oleosa;

(c4) añadir una solución acuosa de ácido cítrico 0,5-1,5 mM, preferiblemente 1 mM;

(c5) tratar con p-hidroxibenzoato de etilo en proporción 1:5 y un emulsionante;

(c6) homogeneizar entre 30-35 minutos;

35 (c7) utilizar una bentonita para absorber la fase líquida y obtener el extracto de aliína en polvo.

Mediante esta etapa (c) se obtiene un extracto de *Allium sativum* que conserva intacto el contenido de aliína y alinasa, de manera que el proceso bioquímico de conversión de aliína en sus derivados se produce al entrar el producto en contacto con la saliva, cuyas condiciones son las idóneas para la activación de la enzima para la hidrólisis de aliínasa; de manera que los beneficios de los pronutrientes contenidos en *Allium sativum* son máximos, ya que la concentración de los mismos equivaldría a ingerirlo en crudo sin pérdidas.

- 10 Preferiblemente, la etapa (d) comprende las siguientes subetapas:
- (d1) molturar y secar las hojas de *Origanum vulgare* para obtener un producto en polvo;
 - (d2) macerar el polvo obtenido en (a1) en etanol, preferiblemente, durante 4 horas;
 - (d3) solidificar la oleorresina obtenida en (a2) por absorción con gel de sílice y evaporar el disolvente, preferiblemente, manteniendo la misma temperatura
 - 15 (d4) centrifugar, preferiblemente, se centrífuga a 6000 rpm durante 30 minutos;
 - (d5) descartar fase acuosa.

De este modo se obtiene el extracto de carvacrol.

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

EJEMPLOS

25

Ejemplo 1. Obtención de ácido elágico a partir de *Punica granatum*

- Se realizó un primer prensado de las cáscaras de *Punica granatum* para la obtención de la parte polvo que contiene ácido elágico en una concentración del 6 %. Este extracto podría considerarse ecológico al no tener ningún tipo de tratamiento químico.

- Para obtener ácido elágico más concentrado, se maceró en ácido clorhídrico metanólico (que se obtiene adicionando 0,190 L de cloruro de acetilo al 98 % por cada litro de metanol). La proporción por cada kilo de cáscara prensada de *Punica granatum* es de 4 litros de ácido clorhídrico metanólico. Esta parte del proceso se llevó a cabo en un congelador y

posteriormente se llevó la suspensión tapada a 70°C durante 30 horas. Posteriormente se destapó y se evaporaron los disolventes.

Una vez sólo queda el residuo seco, se añadió agua al mismo y se centrifugó a 6000 rpm durante 30 minutos, de manera que se eliminan los compuestos hidrosolubles por descarte de la fase acuosa.

Este método de extracción consigue más del doble de la cantidad de ácido elágico (15,4 %) en el extracto con respecto a la extracción con los métodos habituales que se realizan con ácido sulfúrico 2 N (6,1 %).

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

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

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

Por ello, para la extracción del aceite esencial de tomillo se usó una destilación con arrastre de vapor. Debido a la volatilidad y la insolubilidad del aceite en agua se esperará que el producto presente dos fases. Posteriormente se hizo una extracción para separar el aceite esencial puro con un embudo de separación. Se separó el aceite esencial en un recipiente tapado y protegido de la luz para evitar la descomposición lumínica.

Con la parte acuosa se realizó una nueva extracción con éter para lograr así separar finalmente los excedentes de aceite que queden solubilizados en esta fase. De la fase etérea se extrajeron las trazas de agua remanente con sulfato de sodio como desecante. Para reducir la cantidad de componentes a separar mediante cromatografía se realizó una extracción ácido-base.

Para la obtención de los fenoles, entre los cuales el p-cimenol, que son los compuestos de mayor acidez en el aceite esencial, se realizó una extracción ácido-base. En primer lugar, se colocó en el embudo de separación los aceites obtenidos junto con agua destilada. A continuación, se añadieron 50 ml de hidróxido de potasio 1N haciendo que los fenoles, por ser los compuestos más ácidos presentes en aceite, sean solubles en la fase acuosa. Una vez aislada la fase acuosa del resto se llevó a un nuevo embudo de separación para su acidificación con 15 ml ácido clorhídrico 2N y se agregaron 100 ml de éter. De esta manera se obtuvieron solamente los fenoles en fase etérea.

Se juntaron todas las fases etéreas y se filtraron con sulfato de sodio anhidro como desecante para eliminar las trazas de agua. Posteriormente se llevó el compuesto a calentar en baño maría para evaporar el éter y obtener así los fenoles aislados. Este aceite es absorbido con una bentonita, lo que permite tener el producto en un polvo fino con entre un 14 y un 16 % de p-cimenol. Se llevó a cabo una estandarización del extracto para comprobar la pureza y riqueza del mismo.

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

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

Para incrementar la concentración de aliína a partir de esta emulsión se realizó una concentración de aliína. Para ello, se dejó reposar durante 2 horas y se decantó la parte oleosa reduciendo su volumen a la mitad. Se añadió una solución acuosa de ácido cítrico 1 mM y se trató la emulsión restante con p-hidroxibenzoato de etilo en una proporción de 1:5 y un emulsionante y se homogeneizó durante 30 minutos. De este modo, se obtuvo un extracto de *Allium sativum* con una riqueza de aliína de entre el 20 y el 26 %.

Ejemplo 4. Obtención de carvacrol a partir de las hojas de *Origanum vulgare*

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

Se maceraron 100 kilos de polvo seco de hojas de *Origanum vulgare* con etanol al 96 % en una proporción 1:3 p/v durante 4 horas. Se obtuvo un producto con la consistencia de una oleorresina que es necesario absorber con gel de sílice y procesar en el rotavapor a
10 6000 rpm durante 30 min.

100 kilos de producto en polvo tienen un rendimiento de 12 kg de extracto rico de carvacrol (12 – 15 %). Se llevó a cabo una estandarización del extracto para comprobar la pureza y riqueza del mismo.

Ejemplo 5. Obtención del producto alimenticio.

Una vez todos los principios activos han sido purificados, previo análisis cuantitativo para comprobar las concentraciones, se llevó a cabo la preparación del producto final. Esta
20 preparación tuvo lugar por mezcla simple de los extractos para obtener el producto en forma de líquido.

Para la preparación del producto alimenticio en polvo, se realizó un paso previo de absorción de la solución oleosa de extracto de *Allium sativum*. Se absorbió con una
25 bentonita de granulometría 74 µm la solución oleosa en una proporción de 5 litros por kilo de bentonita.

En este reactor se introdujeron 25 kilos de harina de *Punica granatum*, 25 kilos de harina de *Thymus vulgaris*, 50 kilos de harina de *Allium sativum* y 25 kg de harina de *Origanum
30 vulgare*. Se mezclaron durante 6 minutos, momento en que se puede asegurar la homogeneidad del producto. En este momento se realizó una molturación del producto, para garantizar una granulometría apropiada para el uso en instalaciones industriales, que serán los usuarios finales del producto. El alimento obtenido por la incorporación de ingredientes naturales de plantas aromáticas, está listo para ser consumido con una
35 composición mínima garantizada de 2,25 % en peso de ácido elágico, 3,5 % en peso de p-p-cimenol, 5,5 % en peso de aliína y 2,4 % en peso de carvacrol.

Ejemplo 6. Tests de eficacia

Para demostrar la eficacia del producto de la invención sobre el intestino y frente a la presencia de patógenos, se han realizado varios test, que comparan el uso del producto de invención frente a los antibióticos promotores del crecimiento.

Ejemplo 6.1. El primer ensayo se realizó en Perú y se evaluaron los parámetros productivos en pollos de engorde suplementados con el producto alimenticio frente a un antibiótico promotor del crecimiento. Se evaluó el índice de conversión alimenticia y el efecto del producto de invención sobre el peso relativo intestinal.

Diseño experimental:

Duración: desde el día 0 al sacrificio (42 días)

Número de lotes: 3

Número animales/lotes: 100 animales/lote

Número de réplicas/lote: 10 réplicas/lote

Número totales de animales: 300

Aptitud productiva: broilers

Estirpe: Cobb Vantress 500

Tratamientos:

- Tratamiento 1, T1 (Control): sólo alimento formulado. 10 grupos de 10 animales
- Tratamiento 2, T2 (Producto alimenticio): alimento formulado + Producto alimenticio. 10 grupos de 10 animales.
- Tratamiento 3, T3 (APC): alimento formulado + bacitracina metileno disalicilato. 10 grupos de 10 animales.

Resultados:

Tabla 1: Alimento consumido en gramos por repetición para cada tratamiento, (véase también figuras 5 y 6)

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	PROMEDIO
T1	46630	50275	46843	46830	52320	52943	49030	52620	46680	49965	49413.6
T2	49125	51345	50205	46064	47150	44985	45375	52510	47770	53330	48785.9
T3	53310	52405	54085	53370	47356	53025	54455	48235	49325	45720	51128.6

Se observa que el grupo de tratamiento que tuvo un menor consumo de alimento fue el tratamiento T2, que contaba con el producto alimenticio.

Tabla 2: Ganancia de peso semanal por tratamiento en gramos, (véase también figuras 7 y 8)

SEMANA	0	1	2	3	4	5	6	TOTAL
T1	47.73	198.44	489.61	918.68	1545.08	2216.24	2701.12	2.70
T2	47.58	198.55	496.01	933.38	1586.61	2292.73	2782.61	2.78
T3	47.23	199.91	499.21	936.70	1595.24	2312.68	2813.61	2.81

Se observa que los tratamientos T2 y T3 lograron una mayor ganancia de peso en comparación del control.

Tabla 3: ICA por repetición para cada tratamiento, (véase también figuras 9, 10 y 11)

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	PROMEDIO
T1	1.69	1.64	1.63	1.58	1.60	1.63	1.60	1.60	1.57	1.54	1.61
T2	1.53	1.53	1.54	1.45	1.61	1.59	1.56	1.55	1.61	1.61	1.56
T3	1.60	1.55	1.56	1.59	1.55	1.60	1.57	1.63	1.58	1.60	1.58

Índice de conversión alimenticia (ICA): cantidad de alimento requerido para producir un kilogramo de peso vivo de pollo.

El tratamiento T2 que contaba con el producto alimenticio presentó un mejor índice de conversión alimenticia.

Tabla 4: IEPE por repetición para cada tratamiento, (véase también figuras 12 y 13)

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	PROMEDIO
T1	347.04	385.74	366.18	391.06	422.02	391.68	398.22	428.13	354.65	394.94	387.97
T2	421.79	395.80	441.34	407.18	375.27	366.90	385.15	456.23	382.40	389.92	402.20
T3	429.76	453.75	412.94	437.21	367.05	430.72	456.96	376.18	407.18	370.99	414.27

Índice de eficiencia productiva europeo (IEPE):

$$\text{IEPE} = \frac{\text{Viabilidad (\%)} \times \text{Peso (kg)}}{\text{ICA} \times \text{días de engorde}} \times 100$$

El tratamiento T3 presenta un mejor factor de IEPE

Se pudo obtener que el lote con el producto alimenticio obtuvo un peso intestinal relativamente menor en comparación con los otros tratamientos (véase también figura 14).

Conclusiones:

5

El producto alimenticio consigue reducir el índice de conversión de manera significativa en animales que no se encuentran frente un reto marcado.

- El producto alimenticio mejora el ICA un 3.11 %, en comparación con el lote control T1.

10

- El antibiótico promotor del crecimiento mejora el ICA un 1.86 %, en comparación el lote control T1.

Tanto el producto alimenticio como el antibiótico promotor del crecimiento consiguen mejorar el índice de eficiencia (IEPE) sin diferencias significativas.

15

El producto alimenticio consigue reducir el peso del intestino. Esto es un indicativo de una mejora de la eficiencia del órgano (↑ eficiencia, ↓ relativo) gracias al uso el producto alimenticio rico en extractos de plantas.

20

Tanto el producto alimenticio como el antibiótico promotor de crecimiento mejoran la ganancia de peso sin diferencias significativas.

Ejemplo 6.2. El segundo ensayo se realizó en China y se evaluaron los parámetros productivos en cerdos destetados suplementados con el producto alimenticio frente a dos
antibióticos promotores del crecimiento. Se evaluaron parámetros de crecimiento (peso corporal, ganancia de peso e índice de conversión), ratio de diarreas, el efecto del producto alimenticio sobre la estructura del intestino y sobre la flora intestinal bacteriana.

Diseño experimental:

30

Animales: 90 lechones “Y x L” de 25 días de edad con paridad (3 – 6) y pesos parecidos. Todos los cerdos se dividieron en 3 lotes, 3 galpones por lote, 10 cerdos en cada galpón

Duración: 30 días

Tratamientos:

35

- Tratamiento 1, T1 (Control): dieta estándar.

- Tratamiento 2, T2 (APCs): dieta estándar + colistina (20 mg/kg) + bacitracina de zinc (100 mg/kg)
- Tratamiento 3, T3 (Producto alimenticio): dieta estándar + Producto alimenticio(400 mg/kg)

5

Parámetros evaluados y muestreo:

- Peso corporal días 30, 45 y 60
- Contenido intestinal y cecal, se tomaron muestras el día 60 de un cerdo/galpón.

10 Resultados:

Tabla 5: Parámetros productivos y ratio de diarrea los días 30-45

	T1	T2	T3
PESO DÍA 30 (kg)	8.28±0.01 ^{Aa}	8.27±0.03 ^{Aa}	8.27±0.06 ^{Aa}
PESO DÍA 45 (kg)	12.48±0.09 ^{Aa}	13.32±0.23 ^{Bb}	13.25±0.25 ^{BCbc}
GANANCIA PESO (g)	477.14±0.66 ^{Aa}	519.70±25.45 ^{Bb}	509.51±6.34 ^{ABb}
GMD (g)	279.36±6.10 ^{Aa}	336.78±15.03 ^{Bb}	332.10±14.45 ^{Bb}
IC	1.69±0.04 ^{Aa}	1.53±0.07 ^{Aa}	1.54±0.12 ^{Aa}
RATIO DIARREA	4.56±0.83 ^{Aa}	1.76±0.45 ^{Bb}	2.16±0.27 ^{Bb}

Tabla 6: Parámetros productivos y ratio de diarrea los días 45-60

	T1	T2	T3
PESO DÍA 45 (kg)	12.48±0.09 ^{Aa}	13.32±0.23 ^{Bb}	13.25±0.25 ^{BCbc}
PESO DÍA 60 (kg)	20.28±0.13 ^{Aa}	21.49±0.28 ^{Bb}	21.50±0.12 ^{Bb}
GANANCIA PESO (g)	939.94±10.09 ^{Aa}	1010.89±40.24 ^{ABb}	1015.22±17.85 ^{ABb}
GMD (g)	510.81±29.85 ^{Aa}	44.39±18.94 ^{Aab}	550.08±12.15 ^{Aab}
IC	1.85±0.08 ^{Aa}	1.85±0.03 ^{Aa}	1.86±0.04 ^{Aa}
RATIO DIARREA	3.27±0.74 ^{Aa}	1.12±0.36 ^{Bb}	1.63±0.55 ^{Bb}

15

Tabla 7: Parámetros productivos y ratio de diarrea los días 30-60

	T1	T2	T3
PESO DÍA 30 (kg)	8.28±0.01 ^{Aa}	8.27±0.03 ^{Aa}	8.27±0.06 ^{Aa}
PESO DÍA 60 (kg)	20.28±0.13 ^{Aa}	21.49±0.28 ^{Bb}	21.50±0.12 ^{Bb}
GANANCIA PESO (g)	705.54±4.72 ^{Aa}	764.35±33.35 ^{Ab}	762.37±11.01 ^{Ab}
GMD (g)	399.85±4.22 ^{Aa}	440.58±12.76 ^{Bb}	441.09±3.05 ^{Bb}
IC	1.77±0.04 ^{Aa}	1.73±0.03 ^{Aa}	1.73±0.05 ^{Aa}
RATIO DIARREA	2.87±0.52 ^{Aa}	0.92±0.35 ^{Bb}	1.22±0.45 ^{Bb}

Tabla 8: Efecto del producto de invención sobre la estructura del íleo al día 60

	T1	T2	T3
ALTURA VELLOSIDADES (μm)	321.45±48.00 ^{Aa}	415.44±94.44 ^{Bb}	388.25±52.97 ^{ABb}
PROFUNDIDAD CRIPTAS (μm)	156.96±58.59 ^{Aa}	168.76±21.45 ^{Aa}	120.37±22.26 ^{Ab}
ALTURA VELLOS./PROF. CRIPTAS	2.31±0.74 ^{Aa}	2.46±0.78 ^{Aab}	3.23±0.53 ^{ABc}

Tabla 9: Efecto del producto de invención sobre la estructura del yeyuno al día 60

	T1	T2	T3
ALTURA VELLOSIDADES (μm)	391.34±65.15 ^{Aa}	396.46±81.04 ^{Aa}	399.59±45.62 ^{Aa}
PROFUNDIDAD CRIPTAS (μm)	139.37±33.95 ^{Aa}	137.65±21.20 ^{Aa}	124.32±26.84 ^{Aa}
ALTURA VELLOS./PROF. CRIPTAS	2.09±0.16 ^{ABa}	1.98±0.22 ^{Aa}	3.21±0.73 ^{BCb}

Tabla 10: Efecto del producto de invención sobre la estructura del duodeno al día 60

	T1	T2	T3
ALTURA VELLOSIDADES (μm)	307.88±47.28 ^{Aa}	346.40±78.69 ^{ACa}	462.43±29.71 ^{Bb}
PROFUNDIDAD CRIPTAS (μm)	144.43±43.24 ^{Aa}	142.72±19.17 ^{Aa}	138.94±18.99 ^{Aa}
ALTURA VELLOS./PROF. CRIPTAS	2.35±0.50 ^{Aa}	2.36±0.25 ^{ABab}	3.33±0.35 ^{ABb}

5

El producto alimenticio tiene un efecto positivo sobre la estructura del intestino (íleo, yeyuno y duodeno). El uso del producto alimenticio aumenta la superficie de absorción e integridad del intestino (véase también la figura 15).

- 10 El producto alimenticio tiene un efecto positivo sobre la flora intestinal bacteriana. El uso del producto alimenticio produce una estimulación del crecimiento de *Lactobacillus* y reduce *E. coli* (véase también la figura 16).

Conclusiones:

15

El producto alimenticio mejoró los parámetros de crecimiento de los lechones destetados, obteniendo unos resultados similares a los del uso de los antibióticos.

- 20 El producto alimenticio disminuyó el % de diarreas, obteniendo unos resultados similares a los del uso de los antibióticos.

El producto alimenticio mejoró la estructura de las vellosidades intestinales (íleo, yeyuno, ciego), mientras que los antibióticos promotores del crecimiento no tuvieron dicho efecto.

El producto alimenticio mejoró el equilibrio de la flora intestinal: más *Lactobacillus* y menos *E. coli* en comparación con el grupo control.