

COMPOSICIONES DE ADITIVO PARA PIENSOS Y MÉTODOS DE USO

REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de Estados Unidos Nro. 63/255.892, presentada el 14 de octubre de 2021, la cual se incorpora a la presente por referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

[002] La presente divulgación se refiere al campo de los aditivos para piensos para animales y, más específicamente, a las composiciones y métodos para mejorar el rendimiento de los animales domésticos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[003] Se prevé que la población mundial se duplique en los próximos 20 años, lo que duplica la cantidad necesaria de alimentos de origen animal. Este es un desafío que se abordó antes, dado que en la segunda mitad del siglo XX ya se habían duplicado los alimentos de origen animal. Sin embargo, aunque el desafío es similar, los medios para lograrlo son muy distintos. De hecho, en el siglo XX, el espectacular aumento de la producción animal fue posible gracias al progreso en la forma de nutrición clásica, el manejo de las granjas, la genética, y el uso cuasisistemático de antibióticos y compuestos químicos. Hoy en día, la prohibición del uso de antibióticos en la alimentación animal en algunos países, la limitación de los medicamentos terapéuticos a nivel de las granjas en otros países y un mayor uso de alimentos no tradicionales en la dieta de los animales de granja a nivel mundial sin duda están cambiando la interacción entre la dieta y el animal de granja, lo que da como resultado una dieta que es menos sana desde el punto de vista nutricional que en el pasado reciente. A pesar de que la necesidad de alimentos de origen animal se duplica, los alimentos deben producirse respetando el bienestar de los animales, y además teniendo en cuenta las crecientes expectativas de los consumidores de alimentos que sean seguros para el medio ambiente y libres de drogas.

[004] Debido a la espectacular mejora del potencial genético durante los últimos 50 años, los animales de granja modernos tienen un metabolismo muy potente que es impulsado por su rápido crecimiento. La optimización de este metabolismo mediante el suministro de nutrientes y no

nutrientes es un papel fundamental de la dieta dada a estos animales. Los avances en la alimentación, en la nutrición tradicional o en el conocimiento científico han mejorado el rendimiento de estos animales. Por ejemplo, el progreso científico en el papel del hígado, o más recientemente el intestino, ha promovido nuevas formas de abordar los insumos dietéticos en animales de granja. Sin embargo, hay un órgano aún subestimado. Los músculos esqueléticos son, obviamente, la parte más valiosa de los animales productores de carne. Además, los posibles roles de los músculos en el desarrollo del animal no son bien apreciados. Por ejemplo, el músculo esquelético utiliza hasta el 25–30% de la glucosa posprandial, y la salud del músculo esquelético es fundamental para la homeostasis de la glucosa y la energía. En los seres humanos, mejorar la función metabólica del músculo esquelético y la sensibilidad a la insulina podría tener entonces un gran impacto en la fisiología general y mejorar la calidad de vida. Varios factores que están omnipresentes en contextos de animales de granja son perturbadores conocidos de la función metabólica del músculo esquelético, incluido el estrés oxidativo y la inflamación crónica. El desequilibrio entre las citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias tiene un efecto perjudicial sobre la salud muscular. Por ejemplo, la elevación de las citoquinas proinflamatorias circulantes (por ejemplo, $\text{TNF}\alpha$) provoca resistencia a la insulina y altera la homeostasis de la glucosa. Esto se ve exacerbado en animales de granja que están sujetos a inflamación crónica (REF) o en los que la función metabólica de los músculos esqueléticos es potente, haciéndolos muy susceptibles al estrés oxidativo.

[005] Por lo tanto, existe una gran necesidad en la técnica de desarrollar aditivos para piensos que puedan suplantar la necesidad de antibióticos y otros ingredientes mientras mejoran el rendimiento de los animales de granja en un contexto libre de drogas. Asimismo, existe una gran necesidad en la técnica de aditivos para piensos que mejoren la salud muscular en los animales de granja.

SÍNTESIS

[006] La presente divulgación proporciona, en una forma de realización, una composición de ingredientes para piensos para animales que comprende una cantidad efectiva de *Ribes alpinum*, o un extracto de la misma, en donde la cantidad efectiva mejora el rendimiento de un pienso para animales al que se le añade el ingrediente. Como se usa en este documento, "animal" se refiere a todos los animales excepto a los humanos. Los ejemplos de animales son los no rumiantes y los

rumiantes. Los animales rumiantes incluyen, por ejemplo, animales tales como ovejas, cabras, vacas, por ejemplo, bovinos de carne, vacas lecheras, vacas y terneros jóvenes, ciervos, camellos, llamas y canguros. Los animales no rumiantes incluyen animales monogástricos, por ejemplo, cerdos (incluidos, aunque no a modo de limitación, lechones, cerdos en crecimiento y cerdas); aves de corral tales como pavos, patos y pollos (incluidos, aunque no a modo de limitación, pollos de engorde, ponedoras); caballos (incluidos, aunque no a modo de limitación, sangre caliente y sangre fría), peces (incluidos, aunque no a modo de limitación, serviola, arapaima, barbo, lobina, anjova, bocachico, besugo, cabeza de toro, cachama, carpa, bagre, catla, chanos, char, cíclidos, cobia, bacalao, dorada, tambor, anguila, gobio, carpa dorada, gourami, mero, guapote, halibut, java, labeo, lai, locha, caballa, sabalote, mojarra, fango, salmonete, paco, pez perla, pejerrey, perca, lucio, pámpano, cucaracha, salmón, sampa, sauger, lubina, besugo, ojo morado, durmiente, cabeza de serpiente, pargo, róbalo, suela, pie espinal, esturión, pez luna, pez dulce, tenca, terror, tilapia, trucha, atún, rodaballo, vendace, lucioperca y pescado blanco); y crustáceos (incluidos, aunque no a modo de limitación, camarones y langostinos). Entre dichos animales que pueden ser de utilidad de acuerdo con la invención se encuentran incluidas las mascotas, que incluyen, aunque no a modo de limitación, perros y gatos.

[007] En ciertas formas de realización, un pienso para animales provisto en este documento comprende al menos un componente de pienso para animales seleccionado del grupo que consiste en una vitamina, un mineral, un probiótico, una enzima, un saborizante, un aminoácido, una grasa, un aceite esencial y un conservante. Los ejemplos no limitantes de una vitamina incluyen, por ejemplo, vitaminas liposolubles que incluyen vitamina A, vitamina D3, vitamina E y vitamina K, por ejemplo, vitamina K3; y vitaminas hidrosolubles que incluyen vitamina B12, biotina y colina, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, niacina, ácido fólico y pantotenato, por ejemplo, Ca-D-pantotenato y combinaciones de ellos. Los ejemplos no limitantes de un mineral incluyen, por ejemplo, calcio, magnesio, potasio y sodio, y los minerales traza incluyen boro, cobalto, cloruro, cromo, cobre, fluoruro, yodo, hierro, manganeso, molibdeno, selenio y zinc. Los ejemplos no limitantes de un probiótico incluyen, por ejemplo, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium* sp., *Carnobacterium* sp., *Clostridium butyricum*, *Clostridium* sp., *Enterococcus faecium*, *Enterococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Lactobacillus acidophilus*,

Lactobacillus farciminus, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus* sp., *Leuconostoc* sp., *Megasphaera elsdenii*, *Megasphaera* sp., *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus* sp., *Propionibacterium thoenii*, *Propionibacterium* sp. y *Streptococcus* sp. o cualquier combinación de ellos. Los ejemplos no limitantes de una enzima incluyen, por ejemplo, acetilxilano esterasa, acilglicerol lipasa, amilasa, alfa-amilasa, beta-amilasa, arabinofuranosidasa, celobiohidrolasas, celulasa, feruloil esterasa, galactanasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, beta-glucanasa, beta-glucosidasa, lisofosfolipasa, lisozima, alfa-manosidasa, beta-manosidasa (mananasa), fitasa, fosfolipasa A1, fosfolipasa A2, fosfolipasa D, proteasa, pululanasa, pectinesterasa, triacilglicerol lipasa, xilanasa, beta-xilosidasa o cualquier combinación de ellos. Los ejemplos no limitantes de un saborizante incluyen, por ejemplo, un sabor floral, de bayas, de nuez, de caramelo, de chocolate, de pimienta, ahumado, de queso o de carne, mentas como menta peperina, sabores cítricos como naranja y limón, vainilla artificial, canela y varios sabores de frutas. Los ejemplos no limitantes de un aminoácido incluyen, por ejemplo, alanina (Ala; A), arginina (Arg; R), asparagina (Asn; N), ácido aspártico (aspartato, Asp; D), cisteína (Cys; C), glutamina (Gln; Q), ácido glutámico (glutamato, Glu; E), glicina (Gly; G), histidina (His; H), isoleucina (Ile; I), leucina (Leu; L), lisina (Lys; K), metionina (Met; M), fenilalanina (Phe; F), prolina (Pro; P), serina (Ser; S), treonina (Thr; T), triptófano (Trp; W), tirosina (Tyr; Y) y valina (Val; V), y cualquier combinación de ellos. Los ejemplos no limitantes de un conservante incluyen, por ejemplo, sorbato de sodio, sorbato de potasio, benzoato de sodio y benzoato de potasio, y combinaciones de ellos.

[008] En algunas formas de realización, la composición de *Ribes alpinum* se obtiene de un extracto de una planta o parte de la misma. En formas de realización adicionales, el extracto se produce a partir de tallos, hojas, flores, ramas, raíces o frutos de una planta o parte de ella, o cualquier combinación de ellos. En aún otras formas de realización, el extracto es un extracto acuoso, etanólico, metanólico, isopropanólico, de acetato de etilo, acetónico o hexano, o mezclas de ellos, o un extracto de CO₂ supercrítico.

[009] En otras formas de realización de una composición proporcionada en el presente documento, la *Ribes alpinum*, o un extracto de la misma, comprende entre aproximadamente el 5% y aproximadamente el 100% de la composición, incluido, por ejemplo, al menos

aproximadamente el 10% de la composición. En otras formas de realización, la *Ribes alpinum*, o un extracto de la misma, en dicha composición comprende al menos un 10% de dicha composición.

[0010] En aún otras formas de realización, la presente divulgación proporciona piensos para animales que comprende una composición de ingredientes de alimentos para animales descrita en el presente documento que comprende una cantidad eficaz de la *Ribes alpinum* o un extracto de la misma, en una cantidad eficaz para mejorar el rendimiento zootécnico en un animal alimentado con pienso para animales en relación con un pienso de control que carece de dicha composición de ingredientes de alimentos para animales. En determinadas formas de realización, el pienso para animales es un pienso para pollos, un pienso para cerdos, un pienso para vacas lecheras o un pienso para ganado vacuno. En formas de realización específicas, el rendimiento zootécnico mejorado es una función muscular mejorada o una ganancia de peso diaria promedio aumentada, una eficiencia alimenticia aumentada, o una tasa de conversión de alimento disminuida.

[0011] El término "índice de conversión de alimento", como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de alimento suministrado a un animal para aumentar el peso del animal en una cantidad específica. Un índice de conversión de alimento mejorado significa un índice de conversión de alimento más bajo o reducido. Por "índice de conversión de alimento más bajo o reducido" o "índice de conversión de alimento mejorado" se entiende que el uso de una composición de aditivo para piensos en alimentos da como resultado que se requiera una menor cantidad de alimento para alimentar a un animal para aumentar su peso en una cantidad específica en comparación con la cantidad de alimento requerida para aumentar el peso del animal en la misma cantidad cuando el alimento no comprende el ingrediente del alimento o la composición del aditivo.

[0012] El término "eficiencia alimenticia" se refiere a la cantidad de aumento de peso por unidad de alimento cuando el animal es alimentado ad libitum o una cantidad específica de alimento durante un período de tiempo. Por "mayor eficiencia alimenticia" se entiende que el uso de una composición de aditivo para piensos de acuerdo con la presente invención sobre alimentación da como resultado una mayor ganancia de peso por unidad de consumo de alimento en comparación con un animal alimentado sin que esté presente el ingrediente del alimento o la composición de aditivos.

[0013] En diversas formas de realización, la *Ribes alpinum*, o un extracto de la misma, está presente en una cantidad de aproximadamente 3 g a aproximadamente 100 g, a aproximadamente 200 g o aproximadamente 500 g por tonelada métrica de alimento para animales. En ciertas formas de realización, la *Ribes alpinum*, o un extracto de la misma, está presente en una cantidad de aproximadamente 100 mg por kg de alimento para animales.

[0014] En otra forma de realización más, la presente divulgación proporciona un método para mejorar el rendimiento de un pienso para animales que comprende agregar una cantidad eficaz de una composición que comprende *Ribes alpinum*, o un extracto de la misma, como se describe en el presente documento, al pienso para animales. En ciertas formas de realización, el rendimiento mejorado comprende una salud y un rendimiento muscular mejorados, una ingesta de alimento alterada, una ganancia de peso diaria promedio aumentada, una mayor eficiencia alimenticia, una tasa de conversión de alimento disminuida o una producción de leche aumentada en un animal alimentado con dicho pienso para animales en relación con un pienso para animales de control al cual la composición de ingredientes para alimentos para animales no ha sido añadido. En varias formas de realización, el pienso para animales es alimento para pollos, alimento para cerdos, alimento para vacas lecheras o alimento para ganado vacuno.

[0015] En aún otra forma de realización, la presente divulgación también proporciona un método para mejorar el rendimiento zootécnico de un animal que comprende alimentar al animal con un pienso para animales que comprende una composición de ingredientes para alimentos para animales que comprende una cantidad efectiva de *Ribes alpinum*, o un extracto de la misma, en una cantidad eficaz para mejorar el rendimiento zootécnico en un animal alimentado con el pienso para animales en relación con un alimento de control que carece de dicha composición de ingredientes para alimentos para animales. En algunas formas de realización, el animal es un pollo, cerdo, vaca lechera o ganado vacuno. En otras formas de realización, el rendimiento zootécnico mejorado es una salud y un rendimiento muscular mejorados, una ingesta de alimento alterada, una mayor ganancia de peso diario promedio, una mayor eficiencia alimenticia, una menor tasa de conversión de alimento o una mayor producción de leche.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0016] Los expertos en la técnica comprenderán que los dibujos, que se describen a continuación, tienen únicamente fines ilustrativos. Los dibujos no pretenden limitar el alcance de las presentes enseñanzas de ninguna manera.

[0017] La FIG. 1 presenta la concentración en ácido elágico de varias plantas de *Rubus* y *Ribes*. Los datos muestran la concentración promedio de ácido elágico en varias plantas y su desviación estándar.

[0018] La FIG. 2 muestra los recuentos de células musculares de *C. elegans* para el tratamiento de control y el tratamiento con extracto de hoja de *Ribes alpinum*. El extracto de *Ribes alpinum* proporcionó 300 µg/ml que contenían 0,0017 µg/ml de elagitaninos, expresados como ácido elágico después de la hidrólisis. Las barras con letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0,01$).

[0019] La FIG. 3 muestra el trillado de *C. elegans* 7 días después de la etapa L4 para el tratamiento de control y el tratamiento con extracto de hoja de *Ribes alpinum*. El extracto de *Ribes alpinum* proporcionó 300 µg/ml que contenían 0,0017 µg/ml de elagitaninos, expresados como ácido elágico después de la hidrólisis. Las barras con letras diferentes son significativamente diferentes ($P < 0,02$).

[0020] La FIG. 4 muestra que la inclusión de 300 µg/ml de extracto de *Ribes alpinum* estimuló la formación de proteínas y la proliferación de células musculares en células C2C12 *in vitro*. El eje Y muestra el contenido de proteína utilizado como estimación de la proliferación de células musculares en porcentaje del control. La barra negra es el control sin adición de extracto vegetal; la barra sombreada es el tratamiento con extracto de *Ribes alpinum*. Las desviaciones estándar se muestran en las barras.

[0021] La FIG. 5 muestra que la adición de dosis crecientes de extracto de *Ribes alpinum* aumentó la captación de glucosa por la célula muscular C2C12 *in vitro*. El eje Y es la respuesta del tratamiento de la planta (barra sombreada) en comparación con el control (barra negra). Las desviaciones estándar se muestran en las barras.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0022] La presente divulgación proporciona un aditivo para piensos para animales domésticos que es capaz de estimular la función y la salud muscular, así como métodos asociados para promover la función y la salud muscular y el rendimiento zootécnico en animales domésticos. El aditivo para piensos para animales provisto en este documento contiene *Ribes alpinum*, o un extracto de la misma. La presente divulgación también describe métodos para mejorar la función y la salud muscular a través de la inclusión dietética de *Ribes alpinum*, o un extracto de la misma.

[0023] Los elagitaninos son polifenoles hidrolizables con efectos beneficiosos para la salud humana. En el tracto gastrointestinal, los elagitaninos se hidrolizan a ácido elágico, que luego es metabolizado a urolitinas por la microbiota del colon. Esto se denominará ácido elágico / urolitinas en la presente memoria descriptiva. El ácido elágico / urolitinas muestran diversos efectos que promueven la salud, es decir, antiproliferación en modelos de células cancerosas, antiinflamación, optimización del metabolismo de los lípidos e inducción de la autofagia. Los estudios en animales han demostrado sus efectos positivos sobre las mitocondrias y la función muscular.

[0024] La presente descripción proporciona formas de realización ejemplares de una nueva composición para incluir en la dieta de animales de granja a fin de aumentar la síntesis de proteínas, la masa muscular y/o la fuerza muscular. Los ejemplos describen la inclusión en la alimentación de los animales de una planta, *Ribes alpinum*, o un extracto de la misma, con la intención de mejorar el rendimiento, el crecimiento muscular y la salud muscular.

[0025] Se sabe que el ácido elágico / urolitinas tienen efecto sobre el crecimiento muscular. Por ejemplo, un experimento con urolitinas en un ensayo de *C. elegans* mostró que se necesita una concentración de 50 μM (11,4 $\mu\text{g/ml}$) para obtener un efecto positivo sobre la función muscular. Dicho de otro modo, se requiere una concentración de 11,4 $\mu\text{g/ml}$ de urolitinas para desencadenar la respuesta de la función muscular. Se han sugerido composiciones que comprenden urolitina con una fuente de proteína o un triglicérido de cadena media o un ribósido de nicotinamida, respectivamente, para tratar afecciones patológicas relacionadas con los músculos. También se han sugerido composiciones que incluyen urolitina para aumentar el tamaño de las células musculares. En conjunto, está claro que el ácido elágico / las urolitinas promueven la función muscular y el crecimiento muscular.

[0026] La producción de urolitinas se puede desencadenar al incluir en la dieta consumida por un sujeto una fuente dietética de elagitaninos, que se digerirá en ácido elágico y luego se fermentará en urolitinas. Una fuente dietética bien conocida de elagitaninos son las frutas, nueces, hojas y semillas de ciertas especies de plantas. Por ejemplo, se encuentran altos contenidos, por ejemplo, en la granada y las bayas pertenecientes a las especies *Rubus* y *Ribes*. Según los resultados resumidos anteriormente, se requiere un mínimo de 11,4 mg/ml de urolitina para promover la salud y la función de las células musculares.

[0027] Sin embargo, la presente descripción sorprendentemente descubrió la inclusión de una planta que no contiene o contiene una cantidad muy baja de ácido elágico / urolitina.

Componentes de alimentos para animales

[0028] En el presente documento se proporcionan nuevas composiciones de alimentos para animales con un rendimiento mejorado como resultado de comprender la composición de ingredientes para alimentos para animales descrita en este documento. Diferentes animales domesticados tienen diferentes requisitos de alimentación. Por ejemplo, los ingredientes principales del alimento para pollos son generalmente cereales, incluidos, aunque no a modo de limitación, trigo, maíz, sorgo, avena, cebada o centeno, proteínas, que pueden provenir de harinas de semillas oleaginosas, y grasas o aceites. Sin embargo, se pueden agregar otros ingredientes al alimento para pollos, incluidos, aunque no a modo de limitación, una fuente de calcio, sales, minerales, probióticos, vitaminas, aminoácidos, saborizantes y conservantes. Un alimento de pollo ejemplar para pollitos y pollitas incluye proteína, lisina, metionina, grasa, fibra, calcio, fósforo, NaCl, manganeso, vitamina A y vitamina E.

[0029] Los ingredientes principales en el alimento para cerdos son generalmente cereales, que incluyen, aunque no a modo de limitación, salvado de arroz, arroz partido y maíz, proteínas, que pueden provenir de harinas de semillas oleaginosas como harina de alfalfa o harina de soja, minerales y vitaminas. Sin embargo, se pueden agregar otros ingredientes al alimento para cerdos, incluidos, aunque no a modo de limitación, una fuente de calcio, sales, minerales, probióticos, vitaminas, aminoácidos, saborizantes y conservantes. Un alimento para cerdos ejemplar incluye una fuente de energía (cereales), proteína, vitaminas, minerales, fibra, prebióticos y productos botánicos.

[0030] Los ingredientes principales en la alimentación del ganado lechero son generalmente cereales, proteínas, que pueden provenir de harina de semillas oleaginosas como harina de semilla de algodón o harina de soja, azúcar y grasa. Sin embargo, se pueden agregar otros ingredientes a la alimentación del ganado lechero, incluidos, aunque no a modo de limitación, fibra, una fuente de calcio, sales, minerales, probióticos, vitaminas, aminoácidos, saborizantes y conservantes.

[0031] Los ingredientes principales en la alimentación del ganado vacuno son generalmente cereales, incluidos, aunque no a modo de limitación, trigo, maíz, sorgo, avena, cebada o arroz, y proteínas, que pueden provenir de salvado de arroz desgrasado, pulimento de arroz, harina de trigo salvado o salvado de maíz. Sin embargo, se pueden agregar otros ingredientes al alimento para ganado de carne, incluidos, aunque no a modo de limitación, fibra, grasa, sales, minerales, probióticos, vitaminas, aminoácidos, saborizantes y conservantes.

[0032] Los ingredientes principales en la alimentación de las ovejas son generalmente cereales, como la alfalfa y el maíz, vitaminas, como la vitamina A, la vitamina D y la vitamina E, el selenio, las sales minerales y el fósforo. Sin embargo, se pueden agregar otros ingredientes al alimento para ovejas, incluidos, aunque no a modo de limitación, grasas, probióticos, aminoácidos, saborizantes y conservantes. Un alimento de oveja ejemplar para ovejas y carneros maduros incluye cereales, proteína, grasa, fibra, calcio, cloruro de amonio, fósforo, NaCl, selenio y vitamina A.

[0033] Los ingredientes principales en la alimentación de las cabras son generalmente cereales, como heno, alfalfa, cebada, maíz y avena, proteína, que puede provenir de granos y harinas destiladas, grasa, fibra y minerales como calcio, fósforo, NaCl, cobre, selenio y vitaminas como la vitamina A, la vitamina D y la vitamina E. Sin embargo, se pueden agregar otros ingredientes al alimento para cabras, incluidos, aunque no a modo de limitación, probióticos, aminoácidos, saborizantes y conservantes. Un alimento para cabras ejemplar incluye productos de cereales, proteína, grasa, fibra, fibra de detergente ácido y calcio, fósforo, NaCl, así como cobre, selenio y vitaminas como la vitamina A, la vitamina D y la vitamina E.

[0034] Como se describe en el presente documento, el rendimiento de cualquiera de dichos alimentos para animales puede mejorarse mediante la adición del ingrediente para alimentos para animales proporcionado por la presente divulgación. La cantidad añadida puede optimizarse dependiendo del tipo de alimento, la fisiología del animal, las condiciones en las que se cría el

animal alimentado y otras condiciones, como entenderán los expertos en la técnica según las enseñanzas de la presente divulgación.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

[0035] Las hojas de diversas variedades de bayas se analizaron por HPLC para determinar su contenido de ácido elágico. Las muestras de hojas se extrajeron para obtener los elagitaninos, que luego se hidrolizaron con ácido dando como resultado ácido elágico. El contenido de ácido elágico se determinó mediante un método de HPLC utilizando ácido elágico como estándar externo.

[0036] La FIG. 1 ofrece una descripción general del contenido de ácido elágico, después de la hidrolización. El contenido de ácido elágico en hojas de diferentes variedades de *Rubus fruticosus* varió de 0,68 a 1,65 mg/100 g de peso seco. En hojas de grosella el contenido varió de 6,9 a 19,4 mg/100 g. Se observaron cantidades más altas en muestras de hojas de *Ribes nigrum*, donde el contenido varió de 6,6 a 32,5 mg/100 g. El contenido absoluto más alto de ácido elágico, es decir, 146,6 mg/100 g, se detectó en una muestra de *Ribes aureum*, resp. *R. odoratum* (sin.). El contenido de ácido elágico más bajo se encontró para *Ribes alpinum*, es decir, 0,188 mg/100 g, con 4 de 5 muestras que solo tenían trazas de ácido elágico. Este análisis confirmó que *Ribes alpinum*, aunque es una planta de *Ribes*, solo contiene trazas de ácido elágico.

Ejemplo 2

[0037] Se evaluó el efecto potencial de *Ribes alpinum* sobre el crecimiento muscular en un modelo de prueba de *C. elegans*. El extracto de hoja de *Ribes alpinum* se proporcionó como soluciones de 300 µg/ml en etanol al 50%. Este extracto contenía 0,58 µg/100 mg de elagitaninos (expresados como ácido elágico después de la hidrólisis). Suponiendo que el ácido elágico se convierte totalmente en urolitinas, la concentración de urolitina en *C. elegans* que se trató con el extracto de *Ribes alpinum* es de solo 0,0017 µg/ml.

[0038] Para todos los experimentos, se prepararon medios de crecimiento de nematodos (NGM) suplementados con los extractos de la siguiente manera: se descongeló una única alícuota de muestra en un baño de agua a 45 °C durante 15 minutos. La muestra totalmente disuelta se filtró a través de un filtro estéril de 0,2 µm con una membrana de acetato de celulosa en un tubo Eppendorf limpio de 1,5 ml. Cada extracto se agregó al NGM a una concentración final de 300 µg/ml y se

vertió en placas de Petri. Los controles relevantes incluyeron un control negativo y controles de solvente de etanol, al 0,15% y al 0,075%. Para todas las condiciones, se preparó NGM que también contenía 100 μ M de 5-fluoro-2'-desoxiuridina (FuDR) para evitar la eclosión de la descendencia. Los gusanos sincronizados por edad se colocaron en el NGM suplementado con compuesto desde la etapa L1 hasta la L4 y se evaluaron en cuanto a movilidad y el número de células musculares. En la etapa L4, los gusanos se transfirieron a placas de compuesto. La movilidad y la morfología muscular de los animales se evaluaron adicionalmente a los 7 días luego de L4 (después de que finalizó el período reproductivo).

[0039] Se evaluó la proliferación de células musculares. Se utilizó la cepa de gusano AW306, un animal de tipo salvaje que expresa un marcador nuclear para los núcleos del músculo de la pared corporal. Se criaron los gusanos de L1 a L4 en cada una de las placas de compuesto. Cuando los gusanos alcanzaron la etapa L4, se contó el número de núcleos de células musculares en el cuadrante ventral derecho ($n = 40$).

[0040] Se evaluó la movilidad de los gusanos. Los gusanos de tipo salvaje (cepa, N2) de cada condición (20–25 gusanos) se colocaron en tampón M9 y se tomaron videos usando un microscopio binocular Leica S8aP0 con una cámara Leica DMC2900 y el software LAS v4.12. Las películas se analizaron utilizando ImageJ v1.53. La cantidad de curvas del cuerpo se cuantificó utilizando el complemento wrMTrck (compilación 110622) para ImageJ. Se calcularon las curvas del cuerpo por minuto (BBPM) y se generaron gráficos utilizando GraphPad Prism, que muestran el promedio y el error estándar de la media, donde cada punto representa un solo gusano contado.

[0041] Se observaron los siguientes resultados. El extracto de *Ribes alpinum*, que contenía 0,0017 μ g/ml de elagitaninos (expresados como ácido elágico después de la hidrólisis), mostró un efecto positivo sobre el crecimiento muscular al aumentar la proliferación muscular en la etapa L4 en *C. elegans* (FIG. 2). El extracto de *Ribes alpinum*, que proporcionó 0,0017 μ g/ml de elagitaninos (expresados como ácido elágico después de la hidrólisis), mostró un efecto positivo sobre la función muscular al aumentar el trillado muscular en *C. elegans* 7 días después de L4 (FIG. 3). Considerando que la concentración mínima de urolitina para producir una respuesta de función muscular es de 11.4 mg/ml de urolitina, como se detalló anteriormente, la inclusión de ácido elágico / urolitina es $1.49123E-07$ menor que la dosis mínima. Una dosis tan baja de ácido elágico / urolitina no puede promover el crecimiento muscular. Sorprendentemente, 0,3 mg de extracto de

hoja de *Ribes alpinum*, que suministró 0,0017 µg/ml de ácido elágico / urolitina, mostró un efecto positivo sobre el crecimiento muscular. Se puede concluir que el efecto sobre el crecimiento muscular de *Ribes alpinum* no es causado por los elagitaninos.

Ejemplo 3

[0042] Este ejemplo evaluó el efecto del extracto de *Ribes alpinum* sobre la fisiología de la célula muscular en un bioensayo basado en células.

[0043] El bioensayo se realizó con una línea celular de mioblastos de ratón denominada C2C12. El extracto de *Ribes alpinum* se evaluó a diferentes concentraciones por triplicado. Se midieron dos resultados. En primer lugar, el ensayo de proliferación de células musculares destinado a investigar la influencia del extracto de *Ribes alpinum*, aplicando 300 µg/ml, sobre la proliferación y el crecimiento de las células musculares. La determinación del contenido de proteína se utilizó como medio para identificar la proliferación celular en el modelo *in vitro* aplicado. La primera suplementación de la línea celular de mioblastos de ratón C2C12 con extracto de *Ribes alpinum* se realizó 24 horas después de la siembra. Después de cinco días, se inició la diferenciación de las células. La segunda suplementación con extracto de *Ribes alpinum* se realizó 24 horas después del inicio de la diferenciación. El día 3 de la fase de diferenciación, se realizó la última suplementación con extracto de *Ribes alpinum*. Las células se lisaron 7 días después del comienzo de la diferenciación y se determinó el contenido de proteínas usando un ensayo de Bradford. Se realizó un control de medio con cada lote. Los ensayos se realizaron por triplicado. En segundo lugar, el ensayo de captación de glucosa tenía como objetivo investigar la influencia del extracto de *Ribes alpinum* en la captación de glucosa en las células musculares. Se sembraron células C2C12 y se cultivaron hasta la confluencia (3 días). Las células se diferenciaron durante 4 días para formar miotubos y luego se trataron con extracto de *Ribes alpinum* durante 24 horas. Después de la suplementación, la glucosa se agotó durante 24 horas, seguido del agotamiento de suero durante la noche. Después del lavado, se agregó al medio un análogo de glucosa fluorescente para monitorear la captación de glucosa en células vivas, llamado 2-NBDG (2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)-amino)-2-desoxiglucosa). Después de 30 minutos, se midió la fluorescencia después de lavar y lisar las células. El ensayo se llevó a cabo en n=6.

[0044] Los resultados indicaron que 300 µg/ml de extracto de *Ribes alpinum* aumentaron la proliferación de células musculares (FIG. 4) y que 30 µg/ml aumentaron la captación de glucosa

(FIG. 5). Estos resultados confirmaron el hecho de que la respuesta de crecimiento muscular de *Ribes alpinum* no está mediada por ácido elágico / urolitina. En este ejemplo, se utilizó un ensayo basado en células con células C2C12. Se sabe que solo las bacterias que residen en el intestino pueden convertir el ácido elágico en urolitina (REF). También es bien sabido que este bioensayo basado en células no permite ver un efecto de los componentes que requieren una biotransformación por microbios. Por lo tanto, el efecto del extracto de *Ribes alpinum* sobre la proliferación y función de las células musculares no depende del ácido elágico, que debe ser transformado en urolitina por los microbios intestinales.

[0045] En conjunto, la inclusión de pequeñas cantidades de *Ribes alpinum* en la dieta de los animales de granja se puede utilizar para promover la función y la salud muscular. *Ribes alpinum* puede incluirse en la dieta, en ciertas formas de realización, en hasta 500 g de planta por tonelada métrica de alimento, mientras que en otras formas de realización la dosis es de entre 100 y 200 g de planta por tonelada métrica de alimento.

[0046] Para facilitar la comprensión de esta divulgación, a continuación se definen una serie de términos. Los términos definidos en este documento tienen significados tal como los entiende comúnmente una persona con experiencia ordinaria en las áreas relevantes para la presente divulgación. El uso de la palabra "un" o "una" cuando se usa junto con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o la especificación puede significar "uno", pero también es consistente con el significado de "uno o más", "al menos uno" y "uno o más de uno". El uso del término "o" en las reivindicaciones significa "y/o" a menos que se indique explícitamente que se refiere solo a alternativas o las alternativas se excluyen mutuamente, aunque la divulgación respalda una definición que se refiere solo a alternativas y "y/o." A lo largo de esta solicitud, el término "aproximadamente" se usa para indicar que un valor incluye la variación inherente de error para el dispositivo, el método que se emplea para determinar el valor, o la variación que existe entre los sujetos de estudio.

[0047] Como se usa en esta especificación y reivindicación(es), las palabras "que comprende" (y cualquier forma de comprender, como "comprende" y "consiste"), "que tiene" (y cualquier forma de tener, como "tiene" y "tienen"), "incluyendo" (y cualquier forma de incluir, como "incluye" e "incluyen") o "contener" (y cualquier forma de contener, como "contiene" y "contienen") son incluyentes o abiertos y no excluyen elementos adicionales no enumerados o pasos del método.

En formas de realización de cualquiera de las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento, "que comprende" puede reemplazarse por "que consiste esencialmente en" o "que consiste en". Como se usa en el presente documento, la frase "que consiste esencialmente en" requiere los números enteros o pasos especificados, así como aquellos que no afectan materialmente el carácter o la función de la invención reivindicada. Tal como se utiliza aquí, el término "consistente" se utiliza para indicar la presencia del número entero mencionado (por ejemplo, una característica, un elemento, una característica, una propiedad, un paso de método/proceso o una limitación) o un grupo de números enteros (por ejemplo, característica(s), elemento(s), rasgo(s), propiedad(es), método/pasos del proceso o limitación(es)) solamente.

[0048] El término "o combinaciones de ellos" como se usa en el presente documento se refiere a todas las permutaciones y combinaciones de los elementos enumerados que preceden al término. Por ejemplo, "A, B, C o combinaciones de ellos" pretende incluir al menos uno de: A, B, C, AB, AC, BC o ABC, y si el orden es importante en un contexto particular, también BA, CA, CB, CBA, BCA, ACB, BAC o CAB. Siguiendo con este ejemplo, se incluyen expresamente las combinaciones que contengan repeticiones de uno o más elementos o términos, tales como BB, AAA, AB, BBC, AAABCCCC, CBBAAA, CABABB, etc. El experto en la técnica entenderá que normalmente no hay límite en el número de elementos o términos en cualquier combinación, a menos que el contexto demuestre lo contrario.

[0049] Como se usa en este documento, las palabras de aproximación como, "aunque no a modo de limitación", "aproximadamente", "sustancial" o "sustancialmente" se refieren a una condición que, cuando se modifica, se entiende que no es necesariamente absoluta o perfecta, pero se consideraría lo suficientemente cerca para los expertos ordinarios en la técnica para justificar la designación de la condición como se la presenta. La medida en que la divulgación puede variar dependerá de qué tan grande sea el cambio que se pueda instituir y que un experto en la materia reconozca que la característica modificada todavía tiene las características y capacidades requeridas de la característica no modificada. En general, pero sujeto a la discusión anterior, un valor numérico aquí modificado por una palabra de aproximación como "aproximadamente" puede variar del valor establecido en al menos ± 1 , 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 12 o 15%.

[0050] Todas las composiciones y/o métodos descriptos y reivindicados en el presente documento pueden fabricarse y ejecutarse sin experimentación indebida a la luz de la presente divulgación. Si

bien las composiciones y métodos de esta divulgación se han descripto en términos de formas de realización preferidas, será evidente para los expertos en la técnica que se pueden aplicar variaciones a las composiciones y/o métodos y en los pasos o en la secuencia de los pasos del método aquí descripto sin apartarse del concepto, espíritu y alcance de la divulgación. Por ejemplo, todos los componentes descriptos de las formas de realización preferidas y alternativas son intercambiables, lo que proporciona la divulgación en este documento de muchos sistemas que tienen combinaciones de todos los componentes de las formas de realización preferidas y alternativas. Por lo tanto, esta aplicación está destinada a cubrir cualquier variación, uso o adaptación de la divulgación utilizando sus principios generales. Además, esta solicitud está destinada a cubrir las desviaciones de la presente divulgación que se dan en la práctica conocida o habitual en la técnica a la que pertenece esta divulgación y que se encuentran dentro de los límites de las reivindicaciones adjuntas. Todos los sustitutos y modificaciones similares aparentes para los expertos en la técnica se consideran dentro del espíritu, alcance y concepto de la divulgación tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.