

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 249 153**

21 Número de solicitud: 200401679

51 Int. Cl.:

A23K 1/14 (2006.01)

A23K 1/16 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **30.06.2004**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2006**

Fecha de la concesión: **26.01.2007**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **16.02.2007**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.02.2007

73 Titular/es: **Universidad de Granada
Hospital Real
Cuesta del Hospicio, s/n
18071 Granada, ES
Universidad de Jaén**

72 Inventor/es:
**García-Granados López de Hierro, Andrés;
Lupiañez Cara, José Antonio;
Parra Sánchez, Andrés;
Peragón Sánchez, Juan y
Fernández Navarro, Mónica María**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Ácido maslínico como aditivo para producción animal.**

57 Resumen:

Ácido maslínico como aditivo para producción animal. Utilización de ácido maslínico (2-alfa,3-betadihidroxi-28-carboxiolean-12-eno), sus derivados o productos naturales o concentrados de los mismos que, lo contengan en la preparación, solo o en combinación con otros agentes, de productos aplicables a la producción animal caracterizada porque el producto es inhibidor de la actividad de serín proteasas, mejorador de enzimas productoras de NADPH, del crecimiento del hígado, músculo liso y sus respectivas proteínas titulares, del recambio proteico, del crecimiento corporal y del ordenamiento y compactación y desarrollo de los gránulos del glucógeno y del retículo endoplasmático rugoso de en las células hepáticas.

ES 2 249 153 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

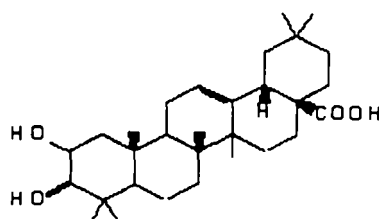
Ácido maslínico como aditivo para producción animal.

5 **Objeto de la invención**

La producción animal tiene una serie de condicionantes sanitarios y económicos imprescindibles para su viabilidad económica. Independientemente de otros parámetros, el gasto correspondiente a la ingesta de alimentos, el tiempo de utilización de instalaciones, con todo lo que ello conlleva, y las pérdidas de beneficio por morbilidad en la especie animal concreta, así como el rendimiento de masa animal obtenido, son factores decisivos para el éxito del planteamiento económico-empresarial. Además de estos parámetros, es preciso tener muy en cuenta el logro del menor consumo posible de recursos naturales y causar el menor impacto ambiental en lo que a la actividad productora se refiere. En este contexto, la utilización de ácido maslínico (2-alfa,3-beta-dihidroxiolean-12-en-28-óico), un inhibidor de proteasas natural, obtenido de los residuos sólidos de la molturación industrial de la aceituna, supone una mejora sustancial en diferentes parámetros histológicos y enzimáticos que redundan entre otras cosas en mejoras desde el punto de vista económico, sanitario y medioambiental, tales como tiempo de cría, cantidad de ingesta, morbilidad animal, excreción de nitrógeno, consumo de recursos naturales (agua) y tiempo de utilización de las instalaciones propias de esta actividad y sus gastos correspondientes.

20 **Estado de la técnica**

El ácido maslínico [Dictionary of Natural Products on CD-ROM, Chapman & Hall, ISSN 0966-2146 ver. 5:1 (1996); Maslinic Acid CAS [4373-41-5]] es un triterpeno poco repartido en el reino vegetal [Phytochemical and EthnobotanicalDB, <http://www.ars-grin.gov/duke/plants.html>], no existiendo fuentes comerciales del mismo. Las actividades biológicas de este tipo de ácidos triterpénicos Pentacíclicos [Selective Inhibition Of Cyclic Amp-Dependent Protein Kinase By Amphiphilic Triterpenoids And Related Compounds, Wang, B.H., Polya, G.M., *Phytochemistry*, 41(1):55-63, (1996)] han sido estudiadas con bastante extensión, particularmente la del ácido oleanólico [Induction Of Differentiation In The Cultured F9 Teratocarcinoma Stem Cells By Triterpene Acids Lee, H.Y., Chung, H.Y., Kim K.H., Lee J.J., Kim K.W., *Journal of Cancer Research & Clinical Oncology*, 120 (9): 513-518, (1994); Effect Of Oleanolic Acid On Hepatic Toxicant-Activating And Detoxifying Systems In Mice, Liu, J., Liu, Y.P., Parkinson, A., Klaassen, C.D., *Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics*, 275(2), 768-774, (1995); Antagonistic Effect of Oleanolic Acid on Anaphylactic Shock, Zhang, L.R., Ma, T.X., *Acta Pharmacologica Sinica*, 16(6), 527-530, (1995); Anti-Angiogenic Activity of Triterpene Acids Shon, K.H., Lee H.Y., Chung, H.Y., Young, H.S., Yi, S.Y., Kim, K.W., *Cancer Letters*, 94(2),213-218, (1995); Pharmacology of Oleanolic Acid and Ursolic Acid, Liu, J., *Journal Of Ethnopharmacology*, 49(2), 57-68, (1995)].



45

50 **Ácido maslínico**

Sin embargo, los trabajos comienzan a ser abundantes para derivados directos de este ácido, que están demostrando actividades interesantes [Antitumor activity of amooranin from Amooro rohituka stem bark, Rabi, T., *Curr. Sci.*, 70 (1), 80-1 (1996); Preparation of triterpene derivatives and medicinal compositions for treatment of nephritis, Ohgi, T., Yoshifusa, H., Kandori, K., *PCT Int. Appl. WO 9600236 A1* (1996); Study of terpenoid exhibiting DNA topoisomerase II inhibition, (CA 124:196916) Nozaki, H.Y. et col, Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu, 37, 349-54 (1995)]. Uno de estos derivados es, precisamente, el ácido maslínico, del que se ha publicado recientemente que posee una potente actividad inhibidora *in vitro* de la proteasa del virus del sida (HIV-1) [Anti-HIV Triterpene Acids from Geum japonicum, Xu, H.X.; Zeng, F.; Wan, M.; Sim, Keng-Yeow *J. Nat. Prod.*, 59(7), 643-645 (1996)]. Otros derivados del ácido oleanólico, como el ácido equinocístico (16-hidroxioleanólico) han demostrado efectos inhibidores frente a la replicación del HIV en células H-9 con valores EC_{50} de 2.3 mM [Anti-AIDS agents, 21. Triterpenoid saponins as anti-HIV principles from fruits of Gleditsia japonica and Gymnocladus chinensis, and a structure-activity correlation, Konoshima, Takao; Yasuda, Ichiro; Kashiwada, Yoshiki; Cosentino, L. Mark; Lee, Kuo-Hsiung, *J. Nat. Prod.*, 58(9), 1372-7, (1995)]. Otros muchos derivados directos han demostrado ser antagonistas del leucotrieno D_4 [Leukotriene D_4 antagonists in *Tripterygium wilfordii*, Morota, Takashi; Saitoh, Kazuko; Maruno, Masao; Yang, Chun-Xin; Qin, Wan-Zhang; Yang, Bing-Hui, *Nat. Med.*, 49(4), 468-71 (1995)] y lo más esperanzador es que una búsqueda farmacófora de inhibidores de proteasas del HIV-1, realizada en el Instituto Nacional del Cáncer (Bethesda, USA) ha señalado a un derivado del ácido maslínico como una base prometedora del desarrollo futuro en esta

actividad [Discovery of Novel, Non-Peptide HIV-1 Protease Inhibitors by Pharmacophore Searching, Wang, Shaomeng; Milne, G. W. A.; Yan, Xinjian; Posey, Isadora; Nicklaus, Marc C.; Graham X Lisa; Rice, William G., *J. Med. Chem.*, 39(10), 2047-54 (1996)] Tanto el ácido oleanólico como el ácido maslínico se encuentran abundantemente en la cera de la piel de las aceitunas [The Lipids of Olea-Europaea 4. Pentacyclic Triterpene Acids in Olives, Bianchi, G., Pozzi, N., Vlahov, G., *Phytochemistry*, 37(1), 205-207, (1994)], y una patente desarrollada por nuestro equipo de investigación y cuya titularidad ostenta la Universidad de Granada [Procedimiento de aprovechamiento industrial de los ácidos 3 β -hidroxiolean-12-en-28-óico (oleanólico) y 2 α ,3 β -dihroxiolean-12-en-28-óico (maslínico) contenidos en los subproductos de la molturación de la aceituna. Patente española P9601652. Patente internacional W098/0433], permite obtener industrialmente estos dos ácidos, por separado y en alto grado de pureza, a partir de subproductos sólidos de la molturación industrial de la aceituna, por cualquiera de los procedimientos ahora empleados (prensas, continuo en tres fases y en el denominado de dos fases), lo que constituye una fuente asequible e inagotable de los mismos. El proceso de separación establecido es sumamente sencillo y eficaz, permitiéndonos aislar estos productos a partir de las complejas mezclas originales.

Como resultado de las pruebas biológicas realizadas se han registrado, hasta ahora, dos patentes por la Universidad de Granada para la obtención de medicamentos como inhibidores de proteasas para el tratamiento de las enfermedades producidas por los protozoos del género *Cryptosporidium* [Utilización de ácido maslínico como inhibidor de serín-proteasas para el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos de género *Cryptosporidium* (P9701029)]. Los ensayos realizados sobre línea celular MDCK muestran un porcentaje de inhibición de infección 92,3% a 37 mg/mL. En el caso de los virus causantes del sida, las pruebas han dado lugar a la patente *Utilización de ácido maslínico como inhibidor de proteasas para el tratamiento de la enfermedad causada por los virus de la inmunodeficiencia adquirida* (P9702528).

Por otra parte, la utilización adecuada de determinados inhibidores de proteasas puede constituir una excelente herramienta en la modificación enzimática dirigida, por ejemplo, del equilibrio existente en el recambio proteico durante el crecimiento celular provocando cambios controlados del mismo.

Descripción de la invención

Para el desarrollo de la presente invención, hemos realizado una serie de experiencias encaminadas a determinar la utilidad del ácido maslínico, producto natural aislado industrialmente de los subproductos de la molturación de la aceituna, tanto en la optimización del crecimiento celular mediante la modificación del equilibrio existente en los procesos de recambio continuo de proteínas como en la disminución de la morbilidad de la población animal, al reducir significativamente los procesos de infección generados durante el estrés del cultivo y su correspondiente manipulación.

Nuestros trabajos más estandarizables y los resultados más significativos se han realizado en el cultivo de peces en general, y en la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) en particular, debido a su importancia comercial dentro de la acuicultura continental.

Modo de realización de la invención

Los procedimientos utilizados y los resultados más significativos encontrados se resumen a continuación:

Preparación de dietas: la dieta empleada en este trabajo se elaboró a partir de pienso pulverizado proporcionado Ecotex 30 (alimento extruido específico para truchas) (DİBAQ DİPROTEG). La composición de dicho pienso es la siguiente: Harina de pescado; Aceite de pescado; Trigo y subproductos; Harina de soja; Premix vitamínico mineral; Antioxidante y antifúngico; Vitaminas y minerales, cuya composición nutricional final es Proteínas 44%, Cenizas 7%, Grasas 30%, Fibra 1% y humedad 7%, arrojando un contenido energético por kg de dieta de: Energía bruta: 260,08 kcal; Energía digestiva: 218,56 kcal; Energía metabolizable: 186,8 kcal; Proteína digestible: 90%.

La dosis de inhibidor (ácido maslínico) varió en cada grupo experimental (5 grupos en total): Grupo control (0 mg inhibidor/kg dieta); Grupo 1: 1 mg inhibidor/kg dieta; Grupo 2: 5 mg inhibidor/kg dieta; Grupo 3: 25 mg inhibidor/kg dieta; Grupo 4: 250 mg inhibidor/kg dieta.

El proceso de mezcla del ácido maslínico con la dieta pulverizada se llevó a cabo con la máxima meticulosidad, pues es de extrema importancia que el resultado final fuese una dieta perfectamente homogénea. El siguiente paso consiste en la transformación de la dieta pulverizada en granos con un diámetro adecuado según el tamaño de los peces a lo largo del tiempo. Se prepararon dos dietas de tamaño diferente, una con un diámetro de 1,5 mm y otra con un diámetro de 3 mm. Las dietas ya listas para el consumo se almacenan a salvo de la luz y de la humedad, y a una temperatura de 4°C.

Animales de experimentación: la especie utilizada en este trabajo fue la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), obtenida de una piscifactoría local. El peso de partida de las truchas de cada una de las situaciones experimentales fue de aproximadamente 20 gramos. El rango de peso admitido osciló entre 18 y 20 gramos. Teniendo en cuenta que durante el proceso de aclimatación a las cubas de ensayo es frecuente una pequeña tasa de mortalidad en la población, principalmente debida al estrés, se seleccionaron un 5% más de animales de los que van a hacer falta para la realización de los experimentos programados.

ES 2 249 153 B1

Durante el tiempo de aclimatación al nuevo entorno, las truchas fueron distribuidas uniformemente en tanques independientes de 360 litros, con un flujo continuo de agua (1,5 L/Kg · min) previamente desodorizada y declarada, a una temperatura constante de $15 \pm 1^\circ\text{C}$, gracias a un sistema automático de calefacción-refrigeración. El agua se oxigena hasta alcanzar niveles de saturación (8-9% de O_2) a través de difusores instalados a cada una de las cubas y conectados a un soplante de 1 HP de potencia. Para evitar, en un principio, enfermedades bacterianas se empleó cloramina-T, un antibiótico de efecto tópico que protege de infecciones bacterianas. La dosis empleada fue de 5 gramos de cloramina-T disueltos en dos litros de agua, vertiéndola en las cubas sin flujo de agua, y dejándola actuar durante 10 minutos. Transcurrido ese tiempo se abre de nuevo el flujo de agua, al principio abundante para eliminar el exceso de cloro acumulado y después ajustándolo a las condiciones óptimas mencionadas anteriormente. La desinfección se repitió regularmente (aproximadamente cada 3 semanas), siendo diaria la limpieza de las cubas. A lo largo de todo el proceso de aclimatación las truchas fueron alimentadas “*ad libitum*” con la dieta control previamente preparada. De esta manera los peces se iban acostumbrando a la textura, tamaño y sabor de la misma.

Preparación de los lotes.- Transcurridos 10 días desde su llegada las truchas estaban en perfectas condiciones (no mostraban signos de enfermedad y comían abundantemente). La mortalidad durante la aclimatación fue baja (en torno al 2%). Se procedió entonces a la preparación de los lotes de experimentación, para lo que se prepararon 5 cubas de polietileno de 360 litros (una para cada grupo: control; 1 mg/kg; 5 mg/kg; 25 mg/kg y 250 mg/kg), en las mismas condiciones de flujo de agua, grado de saturación de oxígeno, temperatura, etc. que las empleadas en la aclimatación. Los peces son pesados individualmente tras ser anestesiados con etilenglicol monofenil éter y redistribuidos inmediatamente en las cubas (120 animales/cuba) con un peso medio inicial de $20,00 \pm 0,16$ gramos. Este momento constituía el *Tiempo 0* del periodo de experimentación.

Alimentación de los animales.- La dieta empezó a suministrarse el día después de la pesada. A cada una de las cubas se le proporcionaba ya su dieta específica. Desde el primer día y hasta el final del experimento los peces iban a recibir una dosis de dieta correspondiente al 1,5% del peso total de la cuba, distribuida en dos tomas: 9.00 horas y 16.00 horas. La elección de la dosis y el horario se estableció según la experiencia de otros investigadores, que aseguran que son las condiciones de alimentación óptimas para obtener las mejores tasas de crecimiento [Fauconneau *et al*, 1984; Cowey, 1981].

Control del crecimiento y reajuste de dosis: El primer punto para elaborar la curva de crecimiento del pez completo lo constituía el momento en que se efectuaron los lotes. Ese mismo día se sacrifican 18 animales para determinar el peso inicial del hígado y del músculo blanco (primer punto en la elaboración de la curva de crecimiento de estos dos tejidos) y para la toma de muestras del tiempo inicial, necesarios para la determinación de los parámetros relacionados con el crecimiento (concentración de proteínas, ARN, ADN y medidas enzimáticas). Los peces son pesados cada semana hasta el final del experimento para obtener los puntos necesarios para una buena curva de crecimiento del pez completo. Las muestras para la elaboración de las curvas de crecimiento de los tejidos (hígado y músculo blanco) se toman cada 4 semanas.

Determinación de las velocidades específicas de crecimiento corporal (G_R), del hígado (K_{GH}) y del músculo blanco (K_{GM}) y recambio proteico

La *velocidad específica de crecimiento corporal* (G_R), que representa el porcentaje de incremento de peso por día, se determinó empleando la siguiente ecuación:

$$G_R (\% \text{ día}) = \frac{\text{Ln } W_n - \text{Ln } W_0}{t_n - t_0}$$

siendo:

W_0 = peso del animal en el tiempo 0

W_n = peso del animal en el tiempo “n”

t_0 = tiempo inicial

t_n = tiempo “n”

n = n° de días transcurridos desde el inicio.

La determinación de la *velocidad específica de crecimiento del hígado y del músculo blanco* (K_{GH} y K_{GM} , respectivamente) se efectuaba con una ecuación equivalente a la anterior, pero utilizando el porcentaje diario de crecimiento de proteínas tisulares. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Lowry [Lowry *et al*, 1951]. Los valores del % de incremento de proteínas/día coinciden con los valores de % de incremento de peso/día del hígado y el músculo [Peragón *et al*, 1981].

$$K_G (\% \text{ día}) = \frac{\text{Ln } P_n - \text{Ln } P_0}{t_n - t_0}$$

ES 2 249 153 B1

siendo:

P_n = contenido proteico (mg/ml) del tejido en el tiempo "n".

5 P_0 = contenido proteico (mg/ml) del tejido al inicio.

Para la determinación de las *velocidades fraccionarias de síntesis* (K_S) y *degradación* (K_D) en el hígado y el músculo blanco de la trucha arco iris, nos basamos en la técnica descrita por Garlick y col., aplicada al estudio de peces por Harschemeyer, y modificada por nuestro grupo de investigación [Garlick *et al.*, 1980; Harschemeyer *et al.*, 1983; Pocrnjick *et al.*, 1983; Houlihan *et al.*, 1986, 1988; Peragón *et al.*, 1992].

Para el estudio de los diferentes parámetros del recambio proteico se seleccionaron los tiempos correspondientes a los 58, 153 y 226 días de iniciar el experimento para controlar las posibles diferencias en biosíntesis proteica que tuviesen lugar entre los distintos grupos experimentales. Para este estudio se utilizaron 9 animales en cada punto de tiempo. La solución que se inyectaba a los peces contenía una mezcla de L-[2,6 ^3H] Phe (37 MBq/m; 100 mCi/ml y radiactividad específica 1640 dpm/nmol) y Phe 150 mM. La dosis administrada fue de 0,5 ml/100 g de peso corporal, y representa entre el 5 y el 12,5% del volumen sanguíneo total, asumiendo que el volumen de sangre de un pez representa entre el 10 y el 40% de su volumen corporal [Jones y Randall, 1978]. Dicha solución se inyectaba en la vena caudal después de anestesiarse al animal con etilenglicol monofenil éter. Inmediatamente después de la inyección los animales se devolvían al agua aireada para su recuperación. Dos de los 9 peces utilizados en cada punto son sacrificados a los 2 minutos de la inyección, y el resto a los 45 minutos. A sus respectivos tiempos, los peces son, además, pesados, procediéndose a continuación a la extracción del hígado y el músculo blanco, cuyos pesos también son anotados.

Transformación de la fenilalanina marcada en β -feniletilamina

25 La fenilalanina hidroxilasa, un enzima presente en la muestra, y activo en las condiciones experimentales, cataliza la transformación de la fenilalanina (Phe) en tirosina (Tyr). Para asegurar que la radiactividad que estamos midiendo es la correspondiente a la Phe marcada y no a Tyr que haya podido originarse a partir de ella, se transforman ambos aminoácidos en sus aminas biógenas correspondientes, β -feniletilamina (β -PEA) y tiramina. Una forma sencilla y eficaz de conseguirlo es utilizar la tirosina descarboxilasa (Tyr-DCasa), capaz de descarboxilar tanto la tirosina como la fenilalanina a pH 6,3 y 50°C de temperatura¹⁷. De las dos aminas biógenas formadas, sólo la β -PEA se puede extraer con cloroformo:n-heptano, desechando la tiramina. El pH 6,3 es esencial para que la Phe se separe de los aniones Cl^- y se pueda llevar a cabo la descarboxilación con el máximo rendimiento y efectividad.

35 La determinación de la radiactividad específica de la β -PEA procedente de las dos fracciones se realiza mediante el uso del contador de centelleo y un programa adecuado. Mientras que la determinación de la concentración total de β fenietilamina (β -PEA) se lleva a cabo de acuerdo con el método de Suzuki [Suzuki y Yagi, 1976].

40 La velocidad fraccionaria de síntesis de proteínas (K_S) se calcula a partir de la radiactividad específica de la Phe libre (dpm/nmol) y de la radiactividad específica media de la Phe unida a proteína (dpm/nmol). La velocidad fraccionaria de degradación proteica (K_D) fue calculada por diferencia entre la velocidad de síntesis K_S (%/día) la velocidad de crecimiento K_G (%/día) según la siguiente expresión: $K_D = K_S - K_G$.

45 Para determinar la eficacia de retención de las proteínas (ERP), es decir, el porcentaje de proteína sintetizada que se deposita en el tejido, se empleó la ecuación: $\text{ERP} = (K_G - K_S) \times 100$.

50 La determinación del contenido de ARN en hígado y músculo blanco de la trucha arco iris, se basa en la técnica empleada por Munro y Fleck y modificada por Peragón *et al.* [Munro y Fleck (1966); Peragón *et al.*, 1992]. La determinación de la concentración de ADN en hígado y músculo blanco se basa en el método de Labarca y Paigen [Labarca y Paigen, 1979].

Tratamiento de los tejidos y actividades enzimáticas

55 Se utiliza el hígado y músculo blanco congelados a -80°C, correspondientes a cada una de las situaciones experimentales y a diferentes tiempos del experimento. Los homogenados se preparan a partir de un pool de 6 hígados o de 6 trozos de músculo blanco, utilizando un tampón adecuado de homogenización (TH) en las siguientes proporciones: *Hígado*: 1/10 (p/v) y *Músculo*: 1/5 (p/v) para todos los enzimas. Los homogenados son centrifugados a 105.000xg durante 1 hora a 4°C y el sobrenadante resultante se reparte en alícuotas, que se mantendrán a -80°C hasta el mismo momento en que se vaya a medir la actividad enzimática.

Enzimas productoras de NADPH

65 Determinación de la actividad del enzima málico (EM) en hígado y músculo blanco de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Basada en el método de Ochoa *et al* con algunas modificaciones [Ochoa *et al* 1955].

Determinación de la actividad de la glucosa-6P deshidrogenasa (G6PDH) y de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH) en el hígado y músculo blanco de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). La reacción de la G6PDH es de tipo REDOX simple y bidireccional, y la de la 6PGDH es una descarboxilación oxidativa bidireccional. En ambos

ES 2 249 153 B1

casos la reacción transcurre hacia la formación de equivalentes de reducción (NADPH). El fundamento es la medida espectrofotométrica a 340 nm de la aparición de NADPH tras la actuación de ambas enzimas. Al medir dos enzimas distintos tenemos que preparar dos tipos de cubetas:

- 5 - *Cubetas A*: Como sustrato contienen 1 ml de 6-fosfogluconato (6PG).
- *Cubetas B*: Contienen 0,1 ml de 6-fosfogluconato (6PG) y 0,1 ml de glucosa 6-fosfato (G6P).

10 Las cubetas A nos servirán para la determinación directa de la actividad de la glucosa 6-P deshidrogenasa. La actividad de la 6-fosfogluconato deshidrogenasa es el resultado de la diferencia de los valores obtenidos con las cubetas A y B. [Lupiáñez *et al*, 1987, Peragón *et al*, 1990].

15 Determinación de la actividad de la isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP⁺ en el hígado y músculo blanco de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Se trata de un enzima dependiente de NADP⁺ que cataliza la descarboxilación oxidativa del isocitrato para rendir α -cetoglutarato (α KG). Se mide la aparición de NADPH a 340 nm. Técnica basada en el método descrito por Bernt y Bergmeyer (1983), con algunas modificaciones.

Parámetros relacionados con el crecimiento

20 *Valores medios de los pesos de los diferentes grupos al inicio, mitad y final del experimento*

	Control	1 mg/Kg	5 mg/Kg	25 mg/Kg	250 mg/Kg
25 Peso inicial	20.05±0.16	19.89±0.16	20.08±0.16	19.94±0.15	10.90±0.15
Peso medio	103.22±3.01	114.59±4.84	114.50±2.64	120.63±4.15	128.77±5.06
Peso final	186.39±9.37	209.29±15.98	208.91±7.95	221.32±13.56	237.64±15.89
30 Incremento					
Peso/día	0.74±0.02	0.84±0.04	0.84±0.02	0.89±0.03	0.96±0.04
G_R	0.99±0.03	1.04±0.04	1.04±0.04	1.07±0.04	1.10±0.01
35 L_S	1.14±0.05	1.10±0.06	1.16 ±.06	1.29±0.06	1.29±0.06

40 (n=18; t=226 días. Pesos expresados en gramos ± S.E.M. G_R y L_S en %)

Ingesta diaria absoluta

	Control	1 mg/Kg	5 mg/Kg	25 mg/Kg	250 mg/Kg
45 DIETA	2675.22±	3061.82±	282.00±	2887.33±	3287.92±
	107.01	150.30	115.63	84.70	110.47
50 PROTEINA	1177.10±	1347.20±	1246.08±	1270.42±	1446.69±
	47.09	66.13	50.88	37.27	48.61
LIPIDOS	802.57±3	918.55±	840.60±	866.20±	986.38±
55	2.10	45.09	34.69	25.41	33.14

(n=18; t=226 días. Resultados expresados en mg ó KJ/pez ± S.E.M.)

60

65

ES 2 249 153 B1

Ingesta diaria relativa [mq ó J/g pez]

	Control	1 mg/Kg	5 mg/Kg	mg/Kg	250 mg/Kg
DIETA	25.92±0.90	26.72±1.22	24.73±0.79	94±0.76	25.53±0.93
PROTEINA	11.40±0.39	11.76±0.54	10.88±0.35	53±0.34	11.24±0.41
LIPIDOS	7.78±0.27	8.02±0.37	7.42±0.24	8±0.23	7.66±0.28

(n=18; t=226 días. Resultados expresados en mg ó J/g pez ± S.E.M.)

Índices nutricionales

	Control	1 mg/Kg	5 mg/Kg	25 mg/Kg	250 mg/Kg
FE	0.28±0.01	0.27± 0.01	0.30±0.01	0.31±0.01	0.29±0.01
PER	0.63± 0.02	0.62±0.03	0.67±0.02	0.70±0.02	0.63±0.03

(n=18; t=226 días. FE= g crecimiento/g ingesta. PER= g crecimiento/g proteína ingerida)

REIVINDICACIONES

5 1. Utilización de ácido maslínico (2-alfa,3-betadihidroxi-28-carboxiolean-12-eno), sus derivados o productos naturales o concentrados de los mismos que lo contengan, solo o en combinación con otros agentes, de productos aplicables a la producción animal **caracterizada** porque el producto es un mejorador del crecimiento del músculo blanco, de sus proteínas titulares y del crecimiento corporal.

10 2. Utilización de ácido maslínico (2-alfa,3-betadihidroxi-28-carboxiolean-12-eno), sus derivados o productos naturales o concentrados de los mismos que lo contengan en la preparación, solo o en combinación con otros agentes, de productos aplicables a la producción animal, según reivindicación primera, **caracterizada** porque el producto es inhibidor de la actividad de serin proteasas.

15 3. Utilización de ácido maslínico (2-alfa,3-betadihidroxi-28-carboxiolean-12-eno), sus derivados o productos naturales o concentrados de los mismos que lo contengan en la preparación, solo o en combinación con otros agentes, de productos aplicables a la producción animal, según reivindicación primera y segunda **caracterizada** porque a nivel molecular el producto es un mejorador de enzimas productoras de NADPH y del recambio proteico.

20 4. Utilización de ácido maslínico (2-alfa,3-betadihidroxi-28-carboxiolean-12-eno), sus derivados o productos naturales o concentrados de los mismos que lo contengan en la preparación, solo o en combinación con otros agentes, de productos aplicables a la producción animal, según reivindicaciones anteriores, **caracterizado** por la utilización de los mismos en cantidades comprendidas entre 0,1 mg y 250 mg por kilo por kg de alimento.

25 5. Producto de alimentación animal **caracterizado** por contener ácido maslínico (2-alfa,3-betadihidroxi-28-carboxiolean-12-eno), sus derivados o productos naturales o concentrados de los mismos que lo contengan.

30 6. Producto de alimentación animal **caracterizado** por contener ácido maslínico (2-alfa,3-betadihidroxi-28-carboxiolean-12-eno), sus derivados o productos naturales o concentrados de los mismos que lo contengan en cantidades comprendidas entre 0,1 mg y 250 mg por kilo por kg de alimento.

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 249 153

② Nº de solicitud: 200401679

③ Fecha de presentación de la solicitud: **30.06.2004**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A23K 1/14** (2006.01)
A23K 1/16 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ES 2131467 A1 (UNIVERSIDAD DE GRANADA) 16.07.1999, resumen; reivindicaciones	2
X	ES 2140329 A1 (UNIVERSIDAD DE GRANADA) 16.02.2000, resumen; reivindicaciones	2
X	Secretariado de Comunicación-UGR [en línea] 27.01.2003 [recuperado el 10.10.2005]. Recuperado de Internet <URL: http://prensa.ugr.es/prensa/investigacion/verNota/prensa.php?nota=523 >	1,3-6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
22.02.2006

Examinador
A. Maquedano Herrero

Página
1/1