

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 313**

51 Int. Cl.:

A61K 36/40 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 1/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.07.2014 PCT/AT2014/000148**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.01.2015 WO15010144**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2014 E 14758068 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 3024470**

54 Título: **Aditivo para piensos, alimentos, agua potable o preparaciones farmacéuticas**

30 Prioridad:

23.07.2013 AT 2382013 U

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

20.07.2020

73 Titular/es:

**ERBER AKTIENGESELLSCHAFT (100.0%)
Erber Campus 1
3131 Getzersdorf bei Traismauer, AT**

72 Inventor/es:

**TEICHMANN, KLAUS;
HESSENBERGER, SABINE;
SCHAUERHUBER, CORNELIA;
PFEFFER, MARTIN;
BINDER, EVA, MARIA y
SCHATZMAYR, GERD**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 774 313 T3

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

DESCRIPCIÓN

Aditivo para piensos, alimentos, agua potable o preparaciones farmacéuticas

La presente invención se refiere a un aditivo para piensos, alimentos, agua potable o preparaciones farmacéuticas, preparado a partir de al menos una especie de cornejo, en particular *Cornus mas*, *Cornus officinalis*, *Cornus chinensis* o *Cornus eydeana*.

Los constituyentes de los huesos del fruto del cornejo, y sus efectos, apenas están descritos en la bibliografía. Lee *et al.*, *Biological & pharmaceutical bulletin*, 2011, 34(3), 443-6 describen un posible efecto inhibidor de constituyentes *ex vivo* del hueso de *C. officinalis* sobre la enzima aldosa reductasa, sobre la glicación de proteínas y sobre la cataratogénesis relacionada con la diabetes. Aparte de esto, no se conoce ninguna conexión entre los huesos de cornejo y otras enfermedades, en particular con enfermedades del tracto gastrointestinal. Desde un punto de vista económico, no existe en la actualidad ninguna opción relevante de aprovechamiento para los huesos de cornejo.

A partir de Li Yan *et al.*: "A kind of core of Fructus Corni extract, and its application in the preparation of composition with blood pressure lowering effect" (Un tipo de extracto del hueso de Fructus Corni y su aplicación en la preparación de composición con efecto reductor de la presión sanguínea), referencia de acceso a la base de datos AN-CN-201210000983-A, se conocen extractos de huesos de cornejo para producir preparaciones hipotensoras.

A partir del documento KR 2008098128 A se conoce el uso del cornejo en una mezcla con cereales, agujas de pino y similares, mezcla que se hace fermentar con levadura y se seca, y es utilizada como aditivo para piensos.

En N. Menkovic *et al.*, *Journal of Ethnopharmacology* 133 (2011) 97-107, se encuentran un gran número de plantas medicinales silvestres que crecen en las montañas de Montenegro, así como el posible uso de estas plantas. Entre estas plantas se menciona, entre otros, *Cornus mas*.

El documento DE19938931A1 describe el empleo de, en particular, un extracto metabólico de los frutos de *Cornus officinalis* como insecticida para exterminar o combatir insectos que son particularmente dañinos para la madera útil, tales como las termitas.

La pulpa del fruto de diversas especies de *Cornus* se usa en parte en la industria alimentaria o sanitaria y en hogares particulares. En la medicina asiática, la pulpa del fruto se emplea, por ejemplo, para tratar síntomas gastrointestinales y fiebre. La pulpa del fruto de *C. officinalis* se usa en la medicina tradicional china y es conocida por su acción tónica, analgésica y diurética. Vareed *et al.*, *Life sciences*, 2006, 78(7), 777-84 describen acciones antibacterianas, antihistamínicas, antialérgicas y antipalúdicas de la pulpa del fruto.

Bajo las denominaciones "cornejo", "especies de cornejo" o "grupo del cornejo" se agrupan las especies de *Cornus* estrechamente relacionadas *Cornus officinalis*, *Cornus mas*, *Cornus chinensis*, *Cornus eydeana*, *Cornus volkensis* y *Cornus sessilis*. La estrecha relación dentro del grupo del cornejo está descrita con detalle en la bibliografía (véase, p. ej., Qiu-Yun (Jenny) Xiang, *Evolution*, 2005, 59(8), 1685-1700). Como característica para determinar el grado de parentesco se puede recurrir, entre otras cosas, a propiedades morfológicas tales como, por ejemplo, la forma y disposición de las brácteas, el tipo de inflorescencia, el estado de desarrollo de los botones florales de invierno, el tipo de fruto o el color del fruto, pero en particular también al número de cromosomas y a las propiedades filogenéticas tales como, por ejemplo, la homología de secuencia del ADNr 26S.

En la bibliografía y en el lenguaje corriente, especialmente en el ámbito rural, se conocen un gran número de sinónimos para representantes individuales del grupo del cornejo, y se enumerarán a modo de ejemplo algunas denominaciones comunes y/o sinónimos para las respectivas especies de *Cornus*. Para "*Cornus mas*" son, p. ej., *C. mas* (L.); *Macrocarpium mas*; cornejo amarillo; cornejo europeo; cornejo macho; para "*Cornus officinalis*" son, p. ej., *C. officinalis* (Sieb. et Zucc.); *Cornus mascula*; cornejo asiático, cornejo chino; para "*Cornus chinensis*" son, p. ej., *C. chinensis* (Wangerin), *Macrocarpium chinense*, cornejo chino; para "*Cornus eydeana*" son, p. ej., *C. eydeana* (Xiang) o cornejo de Eyde.

Se entienden por sustancias activas las sustancias aisladas de huesos de cornejo que presentan de por sí un efecto antibacteriano y/o antivírico o, en combinación con harina de hueso de cornejo o extractos de hueso de cornejo, un efecto antibacteriano sinérgico. Se entienden por sustancias activas aisladas aquellas que se presentan en una pureza de al menos 70% en peso, preferiblemente $\geq 80\%$ en peso, en particular $\geq 90\%$ en peso.

En la cría ganadera, la salud del animal es la base para una productividad elevada de la explotación agrícola. Desde la prohibición en toda la UE de promotores de rendimiento antibióticos dentro de la alimentación animal, en el año 2006, se ha recurrido a preparaciones alternativas para promover la salud e incrementar el rendimiento.

Las fases críticas de la cría animal, por ejemplo cuando se les cambia la alimentación o la estabulación, provocan estrés en los animales, lo que actúa de manera negativa sobre el sistema inmunitario. El sistema inmunitario de un animal joven aún no está completamente maduro, lo que favorece aún más a los patógenos ubicuos y oportunistas. Estos pueden adherirse a la pared intestinal y destruirla, lo que tiene un impacto negativo en la arquitectura intestinal, por ejemplo una superficie reabsorbente reducida. Esto puede provocar, en consecuencia, reacciones

alérgicas, septicemia y signos de un shock endotóxico. Las afecciones gastrointestinales, en particular las enfermedades diarreicas, son un problema importante en este contexto, ya que afectan de manera muy negativa al desarrollo, la salud y el rendimiento de los animales.

5 En los animales jóvenes, en especial, el sistema digestivo aún no está suficientemente desarrollado, por lo que la digestión de los alimentos sólidos discurre de forma incompleta. El estómago aún no produce suficiente ácido gástrico, lo que permite a patógenos fundamentalmente sensibles al ácido, tales como salmonelas, por ejemplo, el paso gástrico después de su ingestión y conduce a una disociación inadecuada de los componentes alimenticios poliméricos de alto peso molecular. Junto con la escasa generación de jugos digestivos y enzimas, esto lleva a que en el intestino estén disponibles para los microorganismos cantidades relativamente grandes de componentes
10 alimenticios digeridos de manera incompleta.

En los cerdos de engorde, la ileítis y la colitis son las causas más relevantes de diarrea. Se conocen como patógenos bacterianos las espiroquetas tales como, por ejemplo, *Brachyspira pilosicoli*, cepas patógenas de *Escherichia coli*, coccidios, clostridios y salmonelas. Una infección por *Lawsonia intracellularis* puede provocar engrosamientos, necrosis, hemorragias e inflamación local del intestino delgado.

15 Se pueden transmitir más de 2.000 serotipos de especies de *Salmonella* entre animales y humanos, encontrándose *S. typhimurium* y *S. enteritidis* entre los patógenos causantes de diarrea más comunes transmitidos de animal a ser humano. El control de salmonelas en animales de granja es importante para prevenir enfermedades intestinales infecciosas en los animales de granja y para prevenir la transmisión de enfermedades a seres humanos. Esto último se aplica también a las especies de *Campylobacter*, tales como *C. jejuni*, por ejemplo, que generalmente no son
20 patógenas para los animales de granja, pero sí responsables de enfermedades diarreicas graves en seres humanos. Muchas especies de *Salmonella* pueden causar diarrea, enteritis y septicemia, especialmente en animales jóvenes, o pueden cursar sin síntomas clínicos, lo que puede afectar al crecimiento de los animales de granja y a la conversión del alimento en estos. La colibacilosis o colisepticemia es la enfermedad infecciosa más frecuente en las aves de corral a nivel mundial. Es causada por cepas patógenas de la bacteria *E. coli*, cepas de *coli* y toxinas
25 producidas por estas. La menor ingesta de agua y nutrientes causada por la diarrea representa un problema importante, ya que la deshidratación puede conducir rápidamente a la pérdida de peso y la muerte de los animales jóvenes.

Otros ejemplos de patógenos bacterianos son los clostridios, que están asociados con enfermedades tales como enteritis y dermatitis necróticas. Los estreptococos en los cerdos son importantes como agentes causantes de
30 meningitis, septicemia, artritis y enfermedades de las vías respiratorias.

Además de los patógenos bacterianos, los protozoos también desempeñan un papel como causantes de diarrea. La coccidiosis en las aves de corral, causada por representantes del género *Eimeria*, en particular *E. tenella*, es una de las enfermedades avícolas más importantes. Entre otras cosas, los coccidios provocan diarrea, deficiente conversión del alimento, retraso en el desarrollo animal y, dependiendo de la especie y la cepa del patógeno,
35 también pueden provocar la muerte. Son comunes infecciones secundarias causadas por patógenos bacterianos tales como clostridios o cepas patógenas de *E. coli*. También en otros animales de granja existen coccidios, como en el ganado bovino (*Eimeria zuernii*, *Eimeria bovis*), ovejas y lechones lactantes (especies de *Isospora*). La lucha contra los patógenos coccidianos se basa principalmente en la administración profiláctica de coccidiostáticos. Estos originan la aparición de resistencia, por lo que son de suma importancia soluciones alternativas para combatir la coccidiosis.
40

Además de los patógenos bacterianos y los protozoos, también numerosos virus pueden causar enfermedades diarreicas, solos o en combinación con otros patógenos. En lechones, los coronavirus y rotavirus son particularmente relevantes como desencadenantes de enfermedades diarreicas. Dado que en la práctica a menudo se presentan varios patógenos causantes de diarrea al mismo tiempo, es deseable un remedio con amplio efecto.

45 A pesar de unas buenas condiciones higiénicas y una buena gestión del establo, son inevitables enfermedades siempre recurrentes del ganado tales como enteritis, ileítis, colitis, septicemia, colibacilosis, colisepticemia, dermatitis, meningitis, septicemia, artritis, coccidiosis o enfermedades de las vías respiratorias. Estas enfermedades están directamente relacionadas con una infección por los organismos o virus patógenos antes descritos. Por regla general, los animales enfermos muestran un rendimiento reducido que se caracteriza, por ejemplo, por una mayor
50 incidencia de diarrea, un retraso en la ganancia de peso o una disminución de la conversión del alimento.

El problema de base es que los productos existentes no son lo suficientemente adecuados para prevenir y/o tratar las enfermedades antes mencionadas, en particular enfermedades diarreicas, sobre todo por que en la UE está prohibido el uso preventivo de antibióticos, coccidiostáticos y zinc para el tratamiento de la diarrea.

55 La presente invención pretende ahora poner a disposición un aditivo que sea de origen natural y ecológicamente irreprochable, y que pueda utilizarse para la prevención y/o tratamiento de enfermedades causadas por microbios o virus, preferiblemente enfermedades del tracto gastrointestinal, en particular enfermedades diarreicas, así como para aumentar el rendimiento de los animales de granja y para la desinfección.

Para lograr este objetivo, la presente invención se caracteriza por que están contenidos al menos un componente

seleccionado de harina de hueso de conejo y/o extracto de hueso de conejo y, además, al menos una sustancia adicional obtenida por síntesis química y/o fermentación microbiana, seleccionada de formiato de calcio, ácido benzoico, ácido ascórbico, ácido fórmico o vitamina B12, y eventualmente al menos un componente seleccionado de materiales vehiculantes, sustancias auxiliares de formulación y/o componentes biológicamente activos.

5 Sorprendentemente, con un aditivo semejante es posible inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos tales como, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, cepas patógenas O128:H2 y O8:K87(F4) de *Escherichia coli*, *Campylobacter coli*, toxina tipo A de *Clostridium perfringens*, toxina tipo C de *Clostridium perfringens*, *Streptococcus suis*. El efecto antibacteriano, expresado como la concentración inhibitoria mínima (CIM),
10 mediante la cual se inhibe el crecimiento en al menos 50%, es aproximadamente diez veces más intenso que contra las cepas no patógenas, tales como las bacterias probióticas *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus salivarius*, por ejemplo. Al ser el aditivo, además, al menos una sustancia adicional obtenida por síntesis química y/o fermentación microbiana, a saber, formiato de calcio, ácido benzoico, ácido ascórbico, ácido fórmico y/o vitamina B12, se consigue un efecto sinérgico del aditivo, en particular en lo referente a su efecto antimicrobiano.

15 Sorprendentemente, se ha puesto de manifiesto que los huesos de conejo tienen un efecto antibacteriano sustancialmente mayor que la pulpa del fruto del conejo. Además, se ha encontrado que la composición química de la pulpa del fruto del conejo es distinta casi por completo de la del hueso del conejo y, de hecho, hay muy pocas sustancias extraíbles que sean comunes a la pulpa del fruto y al hueso, y casi ninguna que se presente en cantidades comparables. Se mencionarán como ejemplos de esto el hidroximetilfurfural y la pentagaloíglucosa, que solo se han encontrado en el extracto de hueso, el ácido elálgico, que únicamente se ha encontrado en cantidades
20 traza en la pulpa del fruto, contrariamente al caso del hueso, y el ácido gálico, como sustancia que era detectable en cantidades comparables en el hueso y en la pulpa del fruto. Además, un análisis comparativo análogo de extractos de hueso de *C. mas* y de *C. officinalis* mostró cromatogramas de HPLC-DAD similares, razón por la cual se puede suponer idéntica la composición química de los huesos de estas especies vegetales muy estrechamente relacionadas.

25 Por cada kilogramo de extracto de hueso de conejo se han podido detectar aproximadamente 5.000 mg de pentagaloíglucosa y, sorprendentemente, también aproximadamente 700 mg de ácido gálico, entre 5.700 mg y 10.400 mg de ácido elálgico y aproximadamente 500 mg de loganina y entre 10 mg y 170 mg de dihidroquercetina. Sin embargo, debido a la escasa solubilidad en agua, en el extracto acuoso no se detectó nada de pentagaloíglucosa y se detectaron pequeñas cantidades de dihidroquercetina. Cuantitativamente, la mayor parte del
30 extracto de hueso consiste, no obstante, en proteínas, hidratos de carbono y grasas.

Se conocen efectos antibacterianos del ácido gálico, la pentagaloíglucosa y el ácido elálgico, así como su presencia en agentes para combatir la diarrea (Chen *et al.* 2006; Xiao *et al.* 2013; Verhelst *et al.* 2010; Funatogawa *et al.* 2004).

35 La loganina actúa como antiapoptótico (Li *et al.* 2010) y tiene un efecto inhibitorio contra *E. coli* (Graiou *et al.* 2002). También se ha descrito un efecto antibacteriano de la dihidroquercetina contra *Streptococcus sobrinus*. Sin embargo, las bajas concentraciones de loganina y de dihidroquercetina halladas en el extracto de hueso de conejo no pueden explicar el favorable efecto antibacteriano observado en la harina de hueso o el extracto de hueso.

40 Las sustancias puras ácido gálico, ácido elálgico, pentagaloíglucosa y loganina mostraron, sorprendentemente, un efecto inhibitorio bacteriano significativamente peor, por encima de 500 mg por litro en todos los casos, cuando se compara con el extracto de hueso, cuya concentración inhibitoria mínima se sitúa entre 78 y 156 mg por litro.

Sorprendentemente, estos resultados muestran que la pentagaloíglucosa no contribuye significativamente al efecto antibacteriano de los productos de hueso de conejo, ya que los extractos etanólicos y los acuosos presentan aproximadamente las mismas concentraciones inhibitorias mínimas para *E. coli* O128:H2, *S. typhimurium* y toxina tipo A de *C. perfringens* (véase el Ejemplo 4), pero la sustancia pentagaloíglucosa solo se encuentra en los extractos etanólicos debido a su insolubilidad en agua.
45

En el caso de huesos de otros frutos cuya pulpa posee un efecto antibacteriano, tales como la uva, el endrino, *Cornus sanguinea*, *Cornus kousa* y *Cornus alba*, por ejemplo, no se ha podido encontrar efecto antibacteriano en absoluto, o solo un efecto antibacteriano muy leve, en los huesos. Estos resultados muestran claramente que de un efecto antibacteriano de la pulpa del fruto no se puede inferir *a priori* un posible efecto de los huesos del fruto.
50

Además, con el aditivo según la invención se logran aliviar, gracias al efecto antiinflamatorio, reacciones inflamatorias. El aditivo posee un efecto antiinvasivo, en particular contra el patógeno *Lawsonia intracellularis*. Con el aditivo también se consigue inhibir el crecimiento de coccidios, en particular *Eimeria* sp., en especial *Eimeria tenella*, y fijar agentes patógenos, en particular cepas patógenas de *Escherichia coli* y endotoxinas. También ha sido posible demostrar que el aditivo posee además un efecto antivírico, en particular contra virus que causan diarrea tales como, por ejemplo, coronavirus o rotavirus.
55

El aditivo también presenta un efecto antioxidante, preferiblemente de una intensidad 20% superior, en particular 40% superior, con respecto a la sustancia de referencia Trolox.

- 5 Se denomina percepción de *quorum* (PQ) a la comunicación química entre microorganismos en función de la densidad de células. La PQ está involucrada en numerosas actividades biológicas, tales como bioluminiscencia, formación de biopelículas, secreción de anticuerpos, pero en particular también la secreción de factores de patogenicidad. En la bibliografía se ha podido detectar PQ en algunos microorganismos patógenos, y se la ha asociado con la virulencia de estos. Sorprendentemente, el aditivo conforme a la invención puede reducir la PQ.
- 10 Cuando se utiliza el aditivo en la ganadería, preferiblemente como aditivo para piensos o como aditivo para el agua potable, preferiblemente en cerdos, en especial lechones destetados, incluso a bajas concentraciones se llega a lograr un intenso efecto promotor de la salud. Esto se evidencia por una clara disminución de los casos de diarrea. Como parámetros para cuantificar la diarrea se pueden usar los días con diarrea, la puntuación de la diarrea o los tratamientos farmacológicos con un fármaco adecuado para reducir la diarrea, tal como Enteroxid, por ejemplo.
- 15 Cuando se utiliza un aditivo conforme a la invención en la cría de ganado, preferiblemente como aditivo para piensos o como aditivo para agua potable en cerdos, en particular lechones de cría, o en aves de corral, en particular pollos de engorde, también se logra aumentar el rendimiento del ganado. El aumento en el rendimiento puede demostrarse por medio de parámetros de rendimiento habituales, tales como el peso vivo, la ganancia de peso, en particular la ganancia diaria de peso, la ingesta de pienso, en particular la ingesta diaria de pienso o la tasa de conversión del alimento, por ejemplo.
- Según un desarrollo de la invención, la especie de cornejo utilizada en el aditivo es al menos una seleccionada de *Cornus mas* y *Cornus officinalis*, que tienen una actividad antibacteriana y también antivírica particularmente buena.
- 20 Configurando el aditivo de manera que la harina de hueso de cornejo presente tamaños de grano de 50 µm a 5 mm, preferiblemente de 100 µm a 2 mm, se logra un incremento en el efecto antibacteriano, utilizándose la harina de hueso de cornejo en una concentración de hasta 20 kg por tonelada de pienso, preferiblemente en un intervalo de 0,1 kg a 10 kg por tonelada de pienso, de manera particularmente preferible en un intervalo de 0,5 kg a 5 kg por tonelada de pienso. La harina de hueso de cornejo se puede preparar por molienda de huesos desprovistos de pulpa y secados hasta una humedad residual inferior a 20%. Una vez secados los huesos hasta un contenido residual de
- 25 humedad inferior a 20% en peso, en particular inferior a 13% en peso, los huesos se pueden almacenar y están protegidos frente al ataque microbiano. La molienda de los huesos se puede realizar a escala de laboratorio o industrial con molinos habituales en el comercio, tales como molinos de corte dotados de insertos de tamiz apropiados, por ejemplo.
- Según un desarrollo de la invención, el aditivo está configurado de manera que el extracto de hueso de cornejo es un extracto acuoso de hueso de cornejo, un extracto orgánico de hueso de cornejo, un extracto acuoso/orgánico de hueso de cornejo o un extracto seco de hueso de cornejo producido a partir de estos. Como agente de extracción se pueden emplear, por ejemplo, mezclas de alcohol y agua, tales como mezclas de etanol y agua, o soluciones tampón acuosas, tales como una solución salina tamponada con fosfato, o medio nutriente para microorganismos o cultivo celular, o dióxido de carbono supercrítico u otros agentes de extracción, así como mezclas de los mismos.
- 30 Para preparar un extracto, se puede mezclar la harina de hueso de cornejo con un agente de extracción en cualquier proporción físicamente razonable, preferiblemente en una proporción en volumen de harina de hueso frente a agente de extracción de 1:4 a 1:10. También se pueden usar rangos más estrechos o más amplios de proporción entre el material a extraer y el agente de extracción. Se puede obtener un extracto claro eliminando las sustancias sólidas mediante, por ejemplo, filtración, centrifugación, separación o sedimentación.
- 35 Al estar el aditivo configurado de manera que contenga un extracto de hueso de cornejo que se ha obtenido con un agente de extracción alcohólico, utilizándose como agente de extracción una mezcla alcohol-agua con al menos 30% en volumen de etanol, preferiblemente con al menos 50% en volumen de etanol, se logra incrementar aún más el efecto antibacteriano y el efecto inhibidor de la PQ.
- 40 Se logra una composición particularmente favorable del extracto si se obtiene extracto de hueso de cornejo mediante extracción a una temperatura de extracción en el intervalo de 0 °C hasta el punto de ebullición del agente de extracción, o en su caso mezcla de extracción, preferiblemente en el intervalo de 25 °C a 60 °C, donde el rendimiento de extracción se incrementa al aumentar la temperatura. El rendimiento de extracción se define aquí como el peso de extracto seco referido al peso del material a extraer, y se expresa como porcentaje en peso.
- 45 Según un desarrollo, el extracto de hueso de cornejo contiene, por kilogramo, entre 70 mg y 7.000 mg, preferiblemente entre 350 mg y 1.500 mg, de ácido gálico y/o entre 600 mg y 100.000 mg, preferiblemente entre 2.500 mg y 20.000 mg, de ácido elágico y/o entre 50 mg y 5.000 mg, preferiblemente entre 250 mg y 1.000 mg, de loganina y/o entre 1 mg y 2.000 mg, preferiblemente entre 5 mg y 350 mg, de dihidroquercetina.
- 50 El extracto de hueso de cornejo se puede utilizar en una concentración de hasta 10 kg por tonelada de pienso, preferiblemente en un intervalo de 2 g a 5 kg por tonelada de pienso, de manera particularmente preferible en un intervalo de 10 g a 1 kg por tonelada de pienso.
- 55 Por enriquecimiento y concentración adicionales de componentes activos a partir de los extractos de hueso de cornejo, se puede preparar un extracto de hueso de cornejo purificado. Esto puede efectuarse, por ejemplo, mediante un procedimiento cromatográfico, tal como la cromatografía en columna, o bien mediante pasos de

extracción adicionales con otros agentes de extracción. El extracto de hueso de conejo purificado se puede utilizar en una concentración de hasta 5 kg por tonelada de pienso, preferiblemente en un intervalo de 1 g a 2,5 kg por tonelada de pienso, de manera particularmente preferible en un intervalo de 5 g a 500 g por tonelada de pienso.

5 Además, cualquier extracto de hueso de conejo puede elaborarse para dar extractos secos. Estos se pueden preparar, p. ej., por evaporación del agente de extracción, por liofilización o cualquier otro secado. Por regla general, se origina un polvo capaz de fluir, que se puede mezclar con sustancias mejoradoras de la fluencia. El extracto seco de hueso de conejo se utiliza en una concentración de hasta 10 kg por tonelada de pienso, preferiblemente en un intervalo de 1 g a 5 kg por tonelada de pienso, de manera particularmente preferible en un intervalo de 5 g a 1 kg por tonelada de pienso. Al usar el extracto como pienso o aditivo para pienso, es importante eliminar de la manera más completa posible, antes de la administración, los agentes de extracción eventualmente tóxicos para el animal, a fin de que los residuos de los mismos se sitúen por debajo de las concentraciones que son tóxicas para el animal, al objeto de evitar un perjuicio al animal a causa de restos de metanol, por ejemplo.

Para preparar harina de hueso de conejo activada, se mezcla el extracto de hueso de conejo o el extracto purificado de hueso de conejo con un material de extracción lixiviado y se lleva a sequedad.

15 En un desarrollo preferido de la invención, la harina de hueso de conejo activada se emplea en una concentración de hasta 10 kg por tonelada de pienso, preferiblemente en un intervalo de 1 g a 5 kg por tonelada de pienso, de manera particularmente preferible en un intervalo de 5 g a 1 kg por tonelada de pienso.

20 También se puede preparar un aditivo según la invención utilizando como materiales de partida para obtener harina de hueso de conejo o extracto de hueso de conejo, además de huesos de conejo, también trozos de hueso de conejo, mezclas de huesos de conejo de distintas especies de conejo y/o mezclas de huesos de conejo con huesos de otras especies vegetales. Además de la harina de hueso de conejo, también se pueden emplear como materiales de partida para obtener extracto de hueso de conejo las mezclas de harina de hueso de conejo de distintas especies de conejo y/o las mezclas de harina de hueso de conejo con harina de hueso de otras especies vegetales.

25 Según un desarrollo preferido de la invención, el aditivo está configurado de manera que está contenido al menos otro componente, tal como una sustancia auxiliar de formulación, tal como otro componente vegetal procedente de al menos una especie de conejo, seleccionado del grupo de pulpa del fruto, hojas, corteza, tallo, flores y raíces y/o, como material vehiculante, un material vehiculante fisiológicamente aceptable, preferiblemente maltodextrina, ciclodextrina, carbonato de calcio, almidón, sulfato de sodio, talco, sacarosa, bentonitas y/o zeolitas; un componente para piensos tal como cereal; subproductos de la elaboración de cereal tales como bagazo de destilería o cervecería seco; maíz, trigo, salvado de trigo, arroz, salvado de arroz, ensilados, aceites o grasas de origen vegetal o animal, minerales y/o vitaminas y/o un componente biológicamente activo seleccionado del grupo de probióticos, prebióticos, enzimas para piensos, levaduras, componentes de levadura, ácidos, preferiblemente ácidos orgánicos o sus sales; fitógenos; constituyentes vegetales inmunoestimulantes o bioactivos y sustancias desactivantes de micotoxinas. La sustancia auxiliar de formulación se puede incorporar y mezclar en forma cruda o procesada, por ejemplo en forma de un extracto. Con semejante aditivo se logra mejorar aún más el estado de salud general de los animales de granja y distribuir de manera homogénea todos los componentes. Mediante el empleo de al menos un componente biológicamente activo se logra influir positivamente en la flora intestinal y reducir aún más la tendencia a enfermedades diarreicas.

40 Según un desarrollo de la invención, el aditivo está desarrollado de manera que contiene al menos un agente adicional para la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades diarreicas y/o trastornos digestivos. Con esto se puede reducir aún más la tendencia a enfermedades diarreicas y/o trastornos digestivos, provocada por uno de los siguientes agentes: *Salmonella* sp., cepas patógenas de *Escherichia coli*, *Campylobacter* sp., *Clostridium perfringens*, *Streptococcus* sp., *Lawsonia* sp., *Eimeria* sp. o microorganismos patógenos con capacidad de PQ tales como *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* o *Pseudomonas aeruginosa*, virus tales como rotavirus o coronavirus, o endotoxinas. El aditivo puede tener un efecto igualmente positivo tanto en la ganadería como en la medicina humana.

50 Según un desarrollo de la invención, el aditivo está configurado de manera que el agente adicional para la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades diarreicas y/o trastornos digestivos se selecciona del grupo de antibióticos, coccidiostáticos, Enteroxid y/u óxido de zinc. Con un aditivo semejante se logra prevenir y/o reducir trastornos del tracto gastrointestinal con pequeñas cantidades de uso del aditivo.

55 Según un desarrollo de la invención, están contenidos harina de hueso de conejo y/o extracto de hueso de conejo procedentes de al menos una especie de conejo, en particular *Cornus mas*, *Cornus officinalis*, *Cornus chinensis* o *Cornus eydeana* y, además, al menos una sustancia adicional obtenida por síntesis química y/o fermentación microbiana, seleccionada de formiato de calcio, ácido benzoico, ácido ascórbico, ácido fórmico o vitamina B12, así como eventualmente al menos un componente seleccionado de materiales vehiculantes, sustancias auxiliares de formulación y/o componentes biológicamente activos, para uso en la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades diarreicas, en particular en la ganadería.

A continuación se explica con más detalle la invención por medio del ejemplo representado en el dibujo y también ejemplos de realización. En estos:

la Figura 1 muestra cromatogramas HPLC-DAD de extracto seco de hueso de cornejo (ESHC) de *C. mas* y *C. officinalis* de diversas procedencias. A: *C. mas* de Austria 1, B: *C. mas* de Austria 2, C: *C. mas* de Turquía, D: *C. mas* de Alemania y E: *C. officinalis* de Alemania.

Ejemplo 1: Preparación de harina de hueso de cornejo (HHC), extracto de hueso de cornejo (EHC), extracto seco de hueso de cornejo (ESHC), extracto purificado de hueso de cornejo (EPHC), extracto purificado seco de hueso de cornejo (EPSHC) y extracto activado de hueso de cornejo (EAHC).

Sirvieron como material de partida huesos de cornejo secos de las especies *C. mas* (Austria 2) y *Cornus officinalis* (Alemania). Mediante una secadora industrial comercial se secaron estos hasta un contenido de humedad residual inferior a 13% en peso.

Se preparó HHC por trituración de los huesos de cornejo secos mediante un molino de corte habitual en el comercio (Retsch SM100). Utilizando un inserto de tamiz de 1,0 mm, se obtuvo la siguiente distribución de tamaño de grano: >2.000 μm 0,05%; 1.000-2.000 μm 14,46%; 500-1.000 μm 56,32%; 250-500 μm 19,21% y 125-250 μm 9,96%.

Para preparar un EHC se dispuso HHC en un agente de extracción (AE) en una proporción de 1:4 a 1:10 (1 parte en volumen de material a extraer con 4 a 10 partes en volumen de AE). Sirvieron como AE agua pura, solución salina tamponada con fosfato (tampón PBS: cloruro de sodio 8,0 g/l, cloruro de potasio 0,2 g/l e hidrogenofosfato de disodio 1,42 g/l, pH = 7,4), medio nutriente con 10% en volumen de etanol y mezclas etanol-agua con proporciones de etanol de 50, 70 y 96% en volumen. La extracción se llevó a cabo agitando por sacudidas o removiendo a una velocidad de giro de 50 r. p. m. a 100 r. p. m. El tiempo de extracción se situó entre 1 h y 48 h. Después de la extracción se separaron del extracto las porciones sólidas por filtración o centrifugación, de modo que se obtuvo un extracto claro, y eventualmente esterilizado por filtración esterilizante.

El alcohol utilizado para la extracción se eliminó del EHC por evaporación en un evaporador rotativo. La solución restante se llevó a sequedad por liofilización. Así se obtuvo ESHC como un polvo capaz de fluir.

Se estudió la influencia del tiempo de extracción y de la temperatura de extracción, definida como la temperatura del material a extraer y el AE, sobre el rendimiento de extracción, utilizando una extracción de HHC de *C. mas* que se había preparado con un molino de corte dotado de un inserto de tamiz de 1,0 mm, con una mezcla etanol-agua con 50% de etanol en volumen como AE. La proporción en volumen de material a extraer frente a AE era de 1:6. El rendimiento se define como el peso de ESHC referido al peso empleado de material a extraer, y se expresa en % en peso. El rendimiento de extracción ascendió a 10,36% en peso a 25 °C, a más de 10,75% en peso a 40 °C y a 13,13% en peso a 60 °C, en cada caso con 1 hora de extracción, y a 14,06% en peso a 25 °C, 15,56% en peso a 40 °C y 17,78% en peso a 60 °C, en cada caso con 21 horas de extracción, de lo que se desprende que el rendimiento se eleva al aumentar la temperatura y el tiempo de extracción.

Para preparar un EPHC, se purificó adicionalmente un ESHC de *C. mas* obtenido mediante extracción etanólica. El ESHC se obtuvo por extracción con una mezcla etanol-agua 70:30 y posterior eliminación del etanol en un evaporador rotativo y liofilización del extracto remanente. Se tomaron 700 mg del ESHC en 5 ml de heptano y se purificaron mediante cromatografía en columna. Se utilizó como material de columna gel de sílice 60 comercial con un diámetro de 0,063 mm a 0,200 mm, de la empresa Merck. Las dimensiones de la columna eran 300 x 15 mm. Se utilizó como eluyente un gradiente escalonado de heptano puro, heptano/acetato de etilo 50:50, acetato de etilo puro, acetato de etilo/metanol 75:25, acetato de etilo/metanol 50:50, acetato de metilo/metanol 25:75 y metanol puro, cambiándose la composición del eluyente después de cada 100 ml, para aumentar el poder de elución.

Se recogieron fracciones de 100 ml cada una y se llevaron a sequedad empleando un evaporador rotativo. De todas las fracciones, la fracción número 4 mostró la actividad antibacteriana más intensa contra *E. coli* O128:H2. La fracción número 4 corresponde por lo tanto a un EPHC y, en forma seca, a un EPSHC.

Se prepararon además EPHC o EPSHC por extracción líquido-líquido de ESHC. Se mezclaron 500,52 mg de un ESHC, que se había obtenido por extracción con una mezcla etanol-agua con 70% en volumen de etanol y posterior separación del etanol en un evaporador rotativo y liofilización, con 100 ml de agua y 100 ml de cloroformo y se agitó por sacudidas en un embudo de separación. Se separaron la fase acuosa y la orgánica y se llevaron a sequedad por evaporación en un evaporador rotatorio, obteniéndose 392,12 mg de extracto seco de la fase acuosa y 108,40 mg de extracto seco de la fase clorofórmica. Solo la fase acuosa mostró un efecto antibacteriano, mientras que la fase clorofórmica no mostró ninguna actividad. Por lo tanto, el extracto acuoso corresponde a un EPHC y el extracto seco del mismo corresponde a un EPSHC.

Se preparó una HAHC extrayendo 50,23 g de HHC de *C. mas*, preparada con un molino de corte dotado de inserto de tamiz de 1,0 mm, con 200 ml de etanol al 50% en volumen, con agitación por sacudidas (60 r. p. m., 25 °C) durante 24 horas. A continuación se mezcló el EHC obtenido con la HHC lixiviada y se llevaron a sequedad en un evaporador rotatorio, con lo que resultó la HAHC como un producto capaz de fluir.

Ejemplo 2: Efecto antibacteriano de huesos de frutos.

La determinación de la actividad antibacteriana de las sustancias de prueba se efectuó utilizando una prueba de inhibición con microdilución, conforme a las pautas del "Clinical and Laboratory Standards Institutes" (Instituto de estándares clínicos y de laboratorio, estándares CLSI M45A, M2 y M7). A partir de la inhibición resultante del crecimiento de las cepas bacterianas se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM50), que es la concentración a la que se inhibe en al menos un 50% el crecimiento bacteriano. La CIM50 sirve como medida del efecto antibacteriano de las sustancias. Cuanto menor es este valor, más intenso es el efecto antibacteriano.

Para estudiar el efecto antibacteriano de huesos del fruto del albaricoquero (*Prunus armeniaca*), el cerezo dulce (*Prunus avium*), el cerezo agrio o guindo (*Prunus cerasus*), el ciruelo (*Prunus domestica* spp. *insititia*) y una especie de cornejo (*Cornus mas*), se molieron los huesos con un molino de corte dotado de un inserto de tamiz de 1,0 mm, hasta obtener harina de hueso, se extrajeron en una proporción 1:5 (v/v) con una mezcla etanol-agua con 70% en volumen de etanol, durante 24 h con agitación por sacudidas (50 r. p. m.) a 25 °C, y se preparó un extracto seco de hueso por liofilización tal como se describe en el Ejemplo 1. Se estudió su efecto antibacteriano contra la cepa bacteriana enteropatógena *Escherichia coli* O128:H2.

Se cultivaron distintas concentraciones de los extractos secos de hueso junto con la cepa bacteriana, de acuerdo con lo prescrito en las pautas del CLSI. El intervalo de concentraciones ensayado estaba entre 39 mg y 1.250 mg de extracto seco de hueso por litro de medio. El efecto antibacteriano de los extractos de hueso de albaricoquero (*Prunus armeniaca*), cerezo dulce (*Prunus avium*), cerezo agrio o guindo (*Prunus cerasus*), ciruelo (*Prunus domestica* spp. *insititia*) sobre la cepa bacteriana enteropatógena *Escherichia coli* O128:H2 fue en cada caso CIM50 [mg/l] >1.250 y el del hueso de cornejo (*Cornus mas*) fue CIM50 [mg/l] 78-156. De esto se desprende que, salvo el EHC de *Cornus mas*, ninguno de los extractos de hueso tiene efecto antibacteriano.

Por otra parte, se examinó el efecto antimicrobiano de huesos de otras especies de *Cornus*, a saber, *Cornus sanguinea*, *Cornus kousa* y *Cornus alba*, así como de huesos de otros frutos, a saber, la vid (*Vitis vinifera*) y el endrino (*Prunus spinosa*).

Para estudiar la influencia de los distintos tamaños de grano de la harina de hueso, se preparó harina de hueso de *Cornus mas* en un molino de corte con tres insertos de tamiz diferentes, en concreto 0,5 mm, 1,0 mm y 2,0 mm de diámetro. Para todos los demás huesos se eligió el tamaño de grano de 1,0 mm. Se pesó en cada caso 1 g de harina de hueso en un tubo de centrifuga de 15 ml y se añadieron 9 g de una mezcla etanol-caldo de nutrientes con 10% en volumen de etanol. Se extrajeron las muestras con agitación por sacudidas durante 1 h, en un agitador horizontal (90 r. p. m.) a 25 °C. Después se centrifugó y se utilizó el sobrenadante claro para los ensayos de inhibición.

Los ensayos de inhibición de la actividad antibacteriana se llevaron a cabo con el sistema de ensayos con microdilución frente a *E. coli* O128:H2, tal como se describe en los estándares CLSI M45A, M2 y M7. Se prepararon los extractos con medio nutritivo a los niveles de dilución 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 y 1:128, y se ensayaron. Se usó como indicador del efecto antibacteriano el nivel de mayor dilución que condujo al menos a 50% de inhibición del crecimiento bacteriano en comparación con una mezcla de etanol-caldo nutritivo sin sustancia de prueba (testigo negativo). Cuanto mayor es el nivel de dilución con el que se puede lograr una inhibición del crecimiento de 50%, más intenso es el efecto antimicrobiano de la sustancia de prueba.

Como resultado, se puso de manifiesto que los extractos de hueso de *Cornus mas* podían inhibir el crecimiento de *E. coli* O128:H2 en al menos un 50% incluso con una dilución 1:64 y 1:128. En el caso de los otros extractos de hueso no se detectó ninguna inhibición del crecimiento bacteriano incluso al nivel de dilución más bajo, es decir, 1:4.

Ejemplo 3: Efecto antibacteriano de huesos de cornejo en comparación con pulpa del fruto del cornejo y residuo de destilación de huesos de cornejo.

La determinación de la actividad antibacteriana de las sustancias de prueba se efectuó mediante una prueba de inhibición con microdilución conforme a las pautas del "Clinical and Laboratory Standards Institutes" (estándares CLSI M45A, M2 y M7).

Para poder comparar el efecto antibacteriano de huesos, pulpa del fruto y residuos de destilación de frutos de *C. mas*, se prepararon extractos secos tal como se describe en el Ejemplo 1. La extracción se realizó con una proporción 1:5 (v/v) de una mezcla etanol-agua con 70% en volumen de etanol, durante 24 h con agitación por sacudidas (50 r. p. m.) a 25 °C. Sirvió como residuo de destilación puré fermentado y destilado de frutos de *C. mas*. El puré contenía la pulpa del fruto y la piel, pero no los huesos. El intervalo de concentración utilizado del extracto seco de hueso, del extracto seco de pulpa del fruto y del residuo de destilación iba de 39 mg a 2.500 mg por litro de medio.

En las Tablas 1 y 2 se resumen los resultados. De ellos se desprende que el extracto de hueso posee un efecto antibacteriano mucho mayor que el extracto de pulpa y que el residuo de destilación. El extracto de pulpa y el residuo de destilación casi no tienen efecto antibacteriano en el intervalo de concentración ensayado. Esto se comprobó para las ocho cepas bacterianas patógenas evaluadas, con independencia de que fueran gramnegativas o grampositivas.

Tabla 1: Efecto antibacteriano de extracto de hueso de *C. mas*, extracto de pulpa del fruto de *C. mas* y residuo de destilación de *C. mas* frente a cepas bacterianas gramnegativas patógenas.

	Cepa bacteriana				
	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>E. coli</i> O128:H2	<i>E. coli</i> O8:K87 F4	<i>Campylobacter coli</i>
	Medio nutritivo				
	Caldo alimenticio	Caldo alimenticio	Caldo alimenticio	Caldo de triptona de soja	Caldo de Müller-Hinton
	CIM50 [mg/l]				
Residuo de destilación	1.250 / 2.500	>2.500	>2.500	2.500 / >2.500	2.500 / >2.500
Extracto de pulpa	2.500	>2.500	2.500 / >2.500	>2.500	>2.500
Extracto de hueso	39 / 78	39	78 / 156	313	39 / 156

5 Tabla 2: Efecto antibacteriano de extracto de hueso de *C. mas*, extracto de pulpa del fruto de *C. mas* y residuo de destilación de *C. mas* frente a cepas bacterianas grampositivas patógenas.

	Cepa bacteriana		
	Toxina tipo C de <i>Clostridium perfringens</i>	Toxina tipo A de <i>Clostridium perfringens</i>	<i>Streptococcus suis</i>
	Medio nutritivo		
	Medio para clostridios	Medio para clostridios	Caldo de cerebro y corazón
	CIM50 [mg/l]		
Residuo de destilación	1.250 / >2.500	2.500 / >2.500	2.500
Extracto de pulpa	>2.500	>2.500	2.500
Extracto de hueso	313	156	313

Ejemplo 4: Influencia de la especie de conejo, de la región de cultivo del conejo, de distintas temperaturas de extracción y de distintos agentes de extracción sobre el efecto antibacteriano de huesos de conejo.

10 Se ensayó la influencia de distintas especies de conejo, en concreto *Cornus mas* y *Cornus officinalis*, así como de distintas temperaturas de extracción (25 °C y 60 °C) y diferentes regiones de cultivo (Austria 1 y 2, Turquía y Alemania) sobre el efecto antibacteriano de los huesos, utilizando una prueba de inhibición con microdilución, conforme a las pautas del "Clinical and Laboratory Standards Institutes" (estándares CLSI M45A, M2 y M7).

15 Se usó para todas las pruebas harina de hueso que se había preparado por trituración tal como se describe en el Ejemplo 1. Los extractos se prepararon en una proporción 1:5 (v/v), o bien con agua o con una mezcla etanol-agua con 50% en volumen, 70% en volumen o 96% en volumen de etanol, realizando la extracción con agitación por sacudidas durante 24 horas (50 r. p. m.) a 25 °C. Se procesaron adicionalmente los extractos para obtener extractos secos según se describe en el Ejemplo 1, y se ensayaron.

20 Los resultados para las distintas especies de conejo, temperaturas de extracción y regiones de cultivo demuestran que ni el uso de distintas especies de conejo, ni tampoco la procedencia de la materia prima o las diferentes temperaturas de extracción, han tenido una influencia significativa sobre el efecto antibacteriano de los extractos de hueso contra *E. coli* O128:H2 en caldo alimenticio. Las CIM50 [mg/l] fueron 78 - 156 en el caso de *C. mas* de Austria 1, 156 en el caso de *C. mas* de Austria 2, 156 - 313 en el caso de *C. mas* de Turquía, 156 - 313 en el caso de *C. mas* de Alemania y 156 - 313 en el caso de *C. officinalis* de Alemania.

25 Los resultados de los distintos agentes de extracción sobre el efecto antibacteriano de los extractos muestran que el agente de extracción influye en el efecto antibacteriano de los extractos de hueso, como se muestra en la Tabla 3. El extracto en etanol al 50% en volumen tiene el efecto más intenso contra *E. coli* O128:H2 y *S. typhimurium*, y tiene la misma intensidad que el extracto en agua contra *C. perfringens* tipo A. Los efectos antibacterianos del extracto acuoso, del extracto en etanol al 70% en volumen y del extracto en etanol al 96% en volumen son claramente

apreciables, pero menos pronunciados que los del extracto en etanol al 50% en volumen.

Tabla 3: Efecto antibacteriano de diversos extractos secos de hueso de *C. mas* contra gérmenes patógenos. La temperatura de extracción fue 25 °C. La región de cultivo de *C. mas* fue Austria 1.

Agente de extracción	CIM50 [mg/l]		
	<i>E. coli</i> O128:H2	<i>S. typhimurium</i>	Toxina tipo A de <i>C. perfringens</i>
100% agua	156 - 313	78 - 156	313
50% en volumen de etanol	78 - 156	39	313
70% en volumen de etanol	78 - 156	39 - 78	313
96% en volumen de etanol	156 - 313	78	625

- 5 Los extractos secos de hueso de *C. mas* muestran también un efecto antibacteriano contra un gran número de cepas bacterianas. Se inhibió de manera especialmente buena el crecimiento de cepas patógenas, tales como *S. enteritidis* (CIM50 [mg/l] = 39), *S. typhimurium* (CIM50 [mg/l] = 39 - 78), *E. coli* O128:H2 (CIM50 [mg/l] = 78 - 156) y *Campylobacter coli* (CIM50 [mg/l] = 39 - 156). En contraste, solamente se inhibió el crecimiento de las bacterias probióticas, tales como *E. faecium* y *L. salivarius*, con concentraciones comparativamente muy elevadas, obteniéndose valores de CIM50 entre 625 y 1.250 mg/l.

10 Ejemplo 5: Efecto antiinflamatorio de huesos de conejo.

- El efecto antiinflamatorio de los huesos de conejo se ensayó con macrófagos de ratón estimulados con lipopolisacárido (LPS). El contacto con LPS procedente de bacterias patógenas activa la respuesta inflamatoria de los macrófagos, lo que origina la secreción de monóxido de nitrógeno (NO). Al agregar ESHC, fue posible demostrar su efecto antiinflamatorio, en concreto a través de la disminución de la secreción de NO por las células estimuladas con LPS.

15 Sirvió como material de ensayo un ESHC de *C. mas* como el descrito en el Ejemplo 1.

- Para determinar el efecto antiinflamatorio se sembraron *in vitro* macrófagos (Raw 264.7) en placas de microtitulación de 96 pocillos (20.000 células por pocillo). Como medio nutriente se usó medio de Eagle modificado por Dulbecco (MEMD) de Ham F12 (1:2), suplementado con glutamina 2 mM y 10% en volumen de suero fetal bovino (SFB). Para estimular la reacción inflamatoria, se añadió a las células LPS de *Escherichia coli* O111:B4 (Sigma L2630) 10 ng/ml, y se incubaron durante 24 horas a 37 °C, 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa del aire. El NO formado en la simulación reacciona con oxígeno en escasos segundos para dar nitrito (NO₂). El NO₂ se cuantificó mediante un procedimiento estándar, utilizando el reactivo de Griess (Sigma G4410) fotométricamente a 540 nm. La producción de NO se expresó como "contenido relativo de NO en %". Sirvieron como testigo positivo células que habían sido estimuladas con LPS 10 ng/ml. Sirvió como testigo negativo un testigo celular puro, al que no se había añadido ninguna sustancia de prueba. El contenido de NO relativo medido del testigo positivo se definió como 100,00%, y el del testigo negativo como 0,00%. El ESHC [50 µg/ml] no condujo a ninguna producción significativa de NO, con un contenido relativo de NO de 1,32%. Al añadir el ESHC [50 µg/ml] junto con LPS, la producción de NO pudo reducirse de 100,00% a 80,60%, es decir, 19,40 puntos porcentuales. La reducción del contenido de NO puede verse como una medida del efecto antiinflamatorio de las sustancias. Por lo tanto, se podría demostrar un claro efecto antiinflamatorio de los huesos de conejo.

20 Ejemplo 6: Efecto antiinvasivo de huesos de conejo.

- El efecto antiinvasivo de los huesos de conejo se demostró mediante un ensayo de invasión con *Lawsonia intracellularis*.

Sirvió como material de ensayo un extracto seco de hueso de *Cornus mas* preparado como se describe en el Ejemplo 1. Para el ensayo de invasión se disolvió el extracto seco en etanol al 70%, se diluyó adicionalmente con una solución salina tamponada con fosfato (tampón PBS: composición: cloruro de sodio 8,0 g/l, cloruro de potasio 0,2 g/l e hidrogenofosfato de disodio 1,42 g/l, pH = 7,4) y se filtró a través de un filtro esterilizante de 0,2 µm.

- 40 Se obtuvo *L. intracellularis* en forma de una vacuna viva para administración oral, concretamente Enterisol Ileitis de Boehringer Ingelheim. Se tomó la vacuna en tampón PBS y se liberó de fragmentos insolubles de manera secuencial con un filtro de 5,0 µm y un filtro de 0,8 µm, para obtener una suspensión bacteriana pura (10⁵ bacterias por ml).

- Se añadieron partes alícuotas de la suspensión de *L. intracellularis* a una serie de diluciones de la solución de *C. mas* (en cada caso 100 µl de suspensión y 100 µl de solución de muestra en placas de microtitulación de 96 pocillos) y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C, 8,8% de CO₂ y 8% de O₂. También se incubó *L. intracellularis* en tampón PBS puro y en propanol al 70% como testigo vivo y testigo muerto.

A continuación se tiñeron las bacterias con el kit de viabilidad bacteriana BacLight LIVE/DEAD (Invitrogen, L34856) de acuerdo con las instrucciones, y se analizaron con un citómetro de flujo ACCURI C6. Las *L. intracellularis* muertas y vivas podían distinguirse por su fluorescencia. Para determinar la viabilidad relativa se comparó la viabilidad de las suspensiones de *L. intracellularis* incubadas con *C. mas* con la viabilidad del testigo vivo. La viabilidad relativa disminuye al aumentar las concentraciones de extracto de hueso de *C. mas*, de la siguiente manera: 93% con una concentración de 3,12 mg/l, 89% con una concentración de 6,25 mg/l, 80% con una concentración de 12,50 mg/l, 56% con una concentración de 25 mg/l, 32% con una concentración de 50 mg/l y 15% con una concentración de 100 mg/l. La CIM50 se sitúa entre 25 y 50 mg/l. De este modo se puede demostrar un efecto antibacteriano, y en consecuencia antiinvasivo, de los huesos de *Cornus mas* frente a *L. intracellularis*.

10 Ejemplo 7: Efecto anticoccidiano de huesos de conejo

El efecto anticoccidiano de los huesos de conejo se determinó a través de la inhibición de la invasión del parásito intracelular *Eimeria tenella* por el extracto de hueso de *C. mas* en cultivo celular.

Se utilizó como material de ensayo un extracto seco de hueso de *Cornus mas* como el descrito en el Ejemplo 1. Para los ensayos de inhibición respectivos se disolvió en etanol al 70% este extracto seco y se diluyó con medio para cultivo celular.

Se obtuvieron ooquistes de *E. tenella* del Royal Veterinary Institute (Londres, GB) y se conservaron a 4 °C. Poco antes del experimento, se purificaron esporozoítos de los ooquistes (Mattig *et al.*; Appl Parasitol., 1993, 34:139-142) y se marcaron con el colorante fluorescente CFDA-SE (Schubert *et al.*; Parasitol Res., 2005, 197:59-62).

Se sembraron células MDBK (ECACC = n.º 90050801) en placas de microtitulación de 96 pocillos (50.000 células por pocillo), y transcurridas 24 horas se infectaron con los esporozoítos fluorescentes de *E. tenella*. Se incubaron durante una noche las células infectadas, o bien en distintas concentraciones del material de ensayo o bien en medio de cultivo celular puro, como testigo, a 40 °C y 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa del aire. Durante este período de incubación, entraron esporozoítos en las células MDBK. Después de la incubación, se comprobó la viabilidad de las células MDBK empleando una prueba con sal de tetrazolio (WST-1, Roche, #11644807001).

Se determinó la viabilidad celular relativa en comparación con el testigo. Después se contaron microscópicamente o con un citómetro de flujo los esporozoítos intracelulares fluorescentes, para comparar las tasas de invasión de testigo y ensayo. Se calculó una tasa de inhibición para cada ensayo de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición de la invasión celular [\%]} = 1 - (\text{tasa de invasión de un pocillo de ensayo} / \text{tasa de invasión promedio de los pocillos testigo})$$

30 En la Tabla 4 se resumen los resultados de la prueba de inhibición de la invasión, y muestran un claro efecto anticoccidiano del extracto seco de hueso de *C. mas*, con una CIM50 de 62,5 mg/l. La viabilidad de las células anfitrión no se vio afectada negativamente por la adición del extracto seco.

Tabla 4: Inhibición de la invasión por *E. tenella* mediante el extracto seco de hueso de *C. mas* en células MDBK.

Concentración [mg/l]	Inhibición relativa	Desviación típica relativa de la inhibición	Viabilidad relativa	Desviación típica relativa de la viabilidad
62,50	52%	16%	103%	11%
15,63	14%	23%	110%	8%
3,91	8%	20%	112%	2%

35 Ejemplo 8: Efecto de fijación de patógenos de huesos de conejo

El efecto de fijación de patógenos de los huesos de conejo se demostró mediante el ensayo de fijación de las bacterias enterotóxicas gramnegativas de la cepa *Escherichia coli* O8:K87 (F4).

Sirvió como material de ensayo harina de hueso de *C. mas* que se había preparado triturando huesos con un molino de corte dotado de un inserto de tamiz de 1,0 mm. Con ella se prepararon una suspensión al 1% en peso y una suspensión al 0,1% en peso en solución salina tamponada con fosfato (tampón PBS: composición: cloruro de sodio 8,0 g/l, cloruro de potasio 0,2 g/l e hidrogenofosfato de disodio 1,42 g/l, pH = 7,4). Se incubaron 100 µl de estas suspensiones en una placa de microtitulación, durante una noche a 4 °C. Sirvió como testigo positivo una suspensión de componentes de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* con una conocida buena capacidad de fijación. El experimento se llevó a cabo tal como se describe en Ganner *et al.*; J. Microbiol. Methods; 2010, 83(2), 168 y ss.

Los resultados muestran una fijación clara y dependiente de la concentración de la *E. coli* O8:K87 (F4) patógena por la suspensión de harina de hueso de *C. mas* utilizada. El número de gérmenes fijados se expresa como unidades formadoras de colonias (UFC). La suspensión de harina de hueso de *C. mas* al 1% en peso era comparable en su

intensidad de fijación, con un valor de 463,6 UFC/ml, a la intensidad de fijación de la suspensión de pared celular de levaduras al 1% en peso (607 UFC/ml). Con una concentración 10 veces menor de harina de hueso de *C. mas* se encontró una fijación de patógeno aproximadamente 10 veces menor, de 36,9 UFC/ml.

- 5 Esta buena fijación de gérmenes patógenos por la harina de hueso de *C. mas* tiene un efecto beneficioso sobre las enfermedades diarreicas que generalmente son desencadenadas por estas bacterias. Los gérmenes patógenos se fijan a la matriz del producto en lugar de al epitelio intestinal, y son excretados sin desarrollar su efecto patogénico.

Ejemplo 9: Efecto neutralizante de endotoxina de huesos de conejo.

El efecto neutralizante de endotoxina de los huesos de conejo se determinó utilizando lisado de amebocitos de límulo (ensayo LAL, Endochrome K, Charles River Laboratories, Inc. Charleston, EE. UU. - R1708K).

- 10 Sirvió como material de ensayo harina de hueso de *C. mas* con un tamaño de grano predominante (78% de la masa) de 0,5 - 2 mm. Con agua libre de pirógenos (ALP) o con fluido intestinal simulado (FIS, US Pharmacopeia 25), se prepararon suspensiones de harina de hueso a distintas concentraciones, en concreto 0,1% en peso, 0,05% en peso y 0,01% en peso. Se mezclaron las suspensiones con distintas cantidades de lipopolisacáridos (LPS) a partir de una solución madre de endotoxina de *E. coli* 055:B5 (Sigma Aldrich, L2880) con una concentración de 500.000 unidades de endotoxina por mililitro (UE/ml), de modo que la concentración final de UE en la suspensión era respectivamente 4.000 UE/ml o 10.000 UE/ml. La mezcla de suspensión de harina de hueso de *C. mas* y LPS se agitó por sacudidas durante 2 h a 37 °C y 1.000 r. p. m.

- 15 A continuación se inactivaron por calor (15 min, 70 °C) las muestras y se centrifugaron (RCF 500 durante 30 min). Para el ensayo LAL se utilizó el sobrenadante. El ensayo LAL se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se diluyó el sobrenadante y se transfirió a una placa de microtitulación de 96 pocillos libre de endotoxinas, y a continuación se añadió al sobrenadante diluido (se le enriqueció con) una solución definida de endotoxina (10 UE/ml). La adición de la solución de endotoxina sirvió para determinar la tasa de recuperación. Una tasa de recuperación correcta (50 - 200%) sirvió como criterio de calidad y de exclusión para cada análisis. Después se añadió el reactivo LAL, y se leyó la placa a 37 °C durante 70 minutos en un lector de placas precalentado, a 20 405 nm. El grado de neutralización se calcula utilizando el *software* EndoScan-V 8 de Charles River.

- 25 En el intervalo de concentraciones estudiado de 0,01% en peso a 0,1% en peso, la harina de hueso de *C. mas* mostró un efecto neutralizante de endotoxina muy bueno. En agua libre de pirógenos y con una concentración de LPS de 10.000 UE/ml, mediante una suspensión de harina de hueso al 0,01% en peso se pudo neutralizar el 34,45% del LPS, y mediante una suspensión de harina de hueso al 0,05% en peso el 26,34% del LPS. En la matriz compleja del jugo intestinal artificial y con una concentración de LPS de 4.000 UE/ml, mediante una suspensión de harina de hueso al 0,01% en peso se pudo neutralizar el 33,77% del LPS y mediante una suspensión de harina de hueso al 0,01% en peso el 27,12% del LPS.

Ejemplo 10: Efecto antioxidante de huesos de conejo.

- 35 Se estudió el efecto antioxidante de los huesos de conejo utilizando el ensayo ORAC (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno, por sus siglas en inglés) (ZenBio Inc., EE. UU., NC, #AOX-2). El ensayo ORAC mide la transferencia de átomos de hidrógeno entre especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y el material de ensayo.

Sirvió como material de ensayo un extracto seco de hueso de *C. mas* preparado como se describe en el Ejemplo 1. El extracto seco se ensayó en 5 concentraciones distintas, de 1,56 a 25,00 mg/l.

- 40 El ensayo ORAC se basa en la oxidación del colorante fluorescente fluoresceína sódica. Si el colorante se oxida, su intensidad de fluorescencia disminuye. La oxidación se aceleró con dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-metilpropionamida) (ABAP), que genera ROS, y la disminución de la fluorescencia con el tiempo se midió con un aparato lector de microplacas. En presencia de antioxidantes, tales como el extracto de hueso de *C. mas*, se inhibió la oxidación, lo que condujo a una disminución retardada de la fluorescencia. La determinación del efecto antioxidante de las sustancias de prueba se realizó utilizando la cinética de la disminución de la fluorescencia. Existe una relación lineal dosis-efecto, y la pendiente de la recta se toma como medida de la actividad. Los resultados se expresan en relación con el análogo de vitamina E Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), que sirve como un estándar con capacidad antioxidante conocida. Los efectos antioxidantes de las sustancias de prueba se expresaron como equivalentes de Trolox (ET), correlacionándose la pendiente de la recta de la sustancia de prueba con la del Trolox (definida como 1 ET).

Resultado: el extracto de hueso de *C. mas* mostró una capacidad antioxidante de $0,46 \pm 0,05$ ET. Esto significa que el extracto posee aproximadamente el 46% de la capacidad antioxidante del Trolox puro.

Ejemplo 11: Inhibición de la percepción de *quorum* mediante huesos de cornejo.

El efecto inhibitorio de la percepción de *quorum* (PQ) de los huesos de cornejo se estudió utilizando biosensores, que son cepas indicadoras conocidas tales como *Chromobacterium violaceum* CV026 y *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4) (McClellan *et al.* 1997; Luo *et al.* 2003; Andersen *et al.* 2001).

5 Sirvieron como materiales de ensayo:

Partículas de harina de hueso de *Cornus mas*, con un tamaño de grano de aproximadamente 2 mm.

Extracto seco de hueso de *C. mas*, preparado como se describe en el Ejemplo 1.

Se utilizó como testigo positivo furanona C30 en una concentración 2 mM, que corresponde a 506 µg/ml.

10 El ensayo de inhibición de la PQ se realizó tal como se describe en McClellan *et al.* (1997), pero se han realizado modificaciones. Se cultivaron *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4) en medio para *Agrobacterium* (para 100 ml: 0,3 g de K₂HPO₄, 0,1 g de NaH₂PO₄, 0,1 g de NH₄Cl, 0,03 g de MgSO₄.7H₂O, 0,015 g de KCl, 0,0005 g de CaCl₂, 0,00025 g de FeSO₄.7H₂O) y *Chromobacterium violaceum* CV026 en caldo de triptona de soja (medio TSB, por sus siglas en inglés; Merck 1.05459.0500). Se activó la PQ con una concentración final 200 nM de N-hexanoil-DL-homoserina lactona (C6-AHL). Se aplicaron al agar, en forma de puntos, una partícula de la harina de hueso y dos papeles de filtro, cada uno humedecido con 10 µl de solución de extracto seco de hueso de *C. mas*. Tras una incubación apropiada, como se describe en McClellan *et al.* (1997), se hicieron visibles halos de inhibición en torno a los materiales de prueba, en los cuales la PQ había sido suprimida.

15 El diámetro de los halos de inhibición sirvió para cuantificar la inhibición de la PQ. En la Tabla 5 se muestran los resultados.

20 Se pudo determinar un efecto inhibitorio de la PQ para los dos materiales de prueba de *C. mas* ensayados, presentando el extracto, con independencia del biosensor utilizado, un efecto más intenso que la harina. La inhibición de la PQ presentó distinta intensidad en las cepas indicadoras, y mostró el mayor efecto en *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4).

25 Tabla 5: Efecto inhibitorio de la PQ por harina de hueso de *C. mas* y extracto seco de hueso de *C. mas*, así como por furanona, sobre las cepas indicadoras *C. violaceum* CV026 y *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4).

	Diámetro del halo de inhibición [mm]	
	<i>A. tumefaciens</i> NTL4 (pZLR4)	<i>C. violaceum</i> CV026
Partícula de harina de hueso de <i>C. mas</i>	4	0
Extracto seco de hueso de <i>C. mas</i>		
500 µg/ml	10-12	4-8
250 µg/ml	7	5
100 µg/ml	4	3
Furanona C30 2mM (= testigo positivo)	12	9

Ejemplo 12: efecto antibacteriano sinérgico de HHC y ESHC con aditivos para piensos.

30 La determinación del efecto antibacteriano de sustancias de prueba que son componentes habituales de piensos, en combinación con harina de hueso de *C. mas* (HHC) y extracto seco de hueso del mismo (ESHC), se llevó a cabo utilizando una prueba de inhibición con microdilución conforme a las pautas del "Clinical and Laboratory Standards Institutes" (estándares CLSI M45A, M2 y M7).

35 Se prepararon HHC y ESHC como se describe en el Ejemplo 1. Para el ensayo en formato de placa de microtitulación se emplearon HHC 1.000 mg/l y ESHC 100 mg/l, con lo cual se lograron valores de inhibición superiores a 10% e inferiores a 50%. Se ensayaron aditivos alimenticios habituales tales como ácido fórmico, formiato de calcio, ácido benzoico, ácido ascórbico y vitamina B12, en combinación con las concentraciones de ESHC mencionadas, para determinar si el efecto inhibitorio era el mismo, significativamente mayor o menor que con ESHC solo. La concentración de las sustancias de prueba también se eligió para que se alcanzaran valores de inhibición superiores a 10% e inferiores a 50%. Si una sustancia de prueba no mostraba efecto inhibitorio, se utilizaron 1.000 mg/l.

40 El formiato de calcio, el ácido benzoico y el ácido ascórbico a 1.000 µg/ml, y respectivamente la vitamina B12 y el ácido fórmico a 500 µg/ml, en cada caso junto a ESHC a 100 µg/ml, mostraron un claro efecto antibacteriano sinérgico contra *Salmonella enteritidis*. El efecto inhibitorio de las combinaciones fue significativamente mayor que el de las sustancias individuales.

El índice de sinergia se obtiene dividiendo la inhibición aditiva teórica por la inhibición realmente medida de la combinación de HHC o ESHC con una sustancia de prueba. Si este índice es menor que 1 existe un efecto sinérgico y si el índice vale 1 se trata de un efecto aditivo, mientras que en caso de un índice mayor que 1 existe un efecto antagonista.

- 5 Se entiende aquí por efecto sinérgico un efecto inhibidor de la combinación de HHC o ESHC con una sustancia de prueba que va más allá del efecto inhibidor aditivo teórico, con independencia de que la sustancia de prueba sola tenga o no un efecto inhibidor.

Tabla 6a: Efecto antibacteriano sinérgico contra *S. enteritidis* de HHC junto con diversos aditivos para piensos. El efecto inhibitorio se ha expresado en porcentaje, junto con la desviación típica.

HHC	0 µg/ml	1.000 µg/ml	Inhibición aditiva teórica	Índice de sinergia
	0 (± 0)	30 (± 3)		
+ Formiato de calcio 1.000 µg/ml	7 (± 5)	60 (± 8)	37 (± 8)	0,62
+ Ácido fórmico 500 µg/ml	31 (± 6)	75 (± 3)	61 (± 9)	0,81
+ Ácido benzoico 1.000 µg/ml	27 (± 9)	77 (± 4)	57 (± 12)	0,74
+ Ácido ascórbico 1.000 µg/ml	5 (± 5)	53 (± 6)	35 (± 8)	0,66
+ Vitamina B12 1.000 µg/ml	4 (± 1)	68 (± 6)	34 (± 4)	0,50

10

Tabla 6b: Efecto antibacteriano sinérgico frente a *S. enteritidis* de ESHC junto con diversos aditivos para piensos. El efecto inhibitorio se ha expresado en porcentaje, junto con la desviación típica.

ESHC	0 µg/ml	100 µg/ml	Inhibición aditiva teórica	Índice de sinergia
	0 (± 0)	33 (± 2)		
+ Formiato de calcio 1.000 µg/ml	1 (± 4)	63 (± 11)	34 (± 6)	0,53
+ Ácido fórmico 500 µg/ml	24 (± 10)	81 (± 6)	57 (± 12)	0,70
+ Ácido benzoico 1.000 µg/ml	34 (± 7)	78 (± 2)	67 (± 10)	0,85
+ Ácido ascórbico 1.000 µg/ml	0 (± 5)	53 (± 4)	33 (± 4)	0,62
+ Vitamina B12 1.000 µg/ml	0 (± 3)	68 (± 7)	33 (± 5)	0,48

Ejemplo 13: Aceptación de harina de hueso de conejo en lechones de destete.

- 15 Para comprobar la aceptación de harina de hueso de conejo como aditivo en pienso para lechones, se utilizaron 9 y 18 kg de harina de hueso por tonelada de pienso para cría de lechones en un ensayo cíclico "on/off" durante 4 semanas.

Sirvió como material de ensayo una harina de hueso de *C. mas* que se había preparado como se describe en el Ejemplo 1.

- 20 La configuración experimental contenía 2 grupos, un grupo testigo y un grupo de prueba, cada uno constituido por 2 réplicas en 2 cubículos con 9 lechones en cada uno (edad 35 días = día de prueba 1). El peso inicial medio del grupo testigo de lechones era 11,5 kg, y el de los lechones del grupo de prueba 11,2 kg. El grupo testigo recibió alimento normal para lechones que consistía en 35% de trigo (12% de proteína cruda), 14% de cebada (11% de proteína cruda), 0,2% de aceite de colza, 2,2% de mezcla de fibra, 3,8% de pienso mineral, 19,8% de soja y 25 % de ensilaje de grano entero (70% de materia seca), el grupo de prueba recibió de manera alterna pienso habitual para lechones y pienso mezclado con harina de hueso de *C. mas*.

- 25 La alimentación se realiza en cuatro fases de una semana cada una, con cambio semanal del pienso en el grupo de prueba. Se determinó la ingesta diaria de pienso por cubículo al final de cada fase. En la Tabla 7 se muestra el desarrollo de la ingesta de pienso en las respectivas fases de alimentación, y se pone de manifiesto que la adición de 9 kg y 18 kg de harina de hueso por tonelada de pienso no originó ninguna reducción en el consumo de pienso.
- 30 Todos los lechones se desarrollaron normalmente y no se encontraron problemas de salud durante los controles veterinarios.

Tabla 7: Ingesta de pienso por lechones de destete en el ensayo de aceptación de harina de hueso de *C. mas*.

Fase	Grupo testigo		Grupo de prueba		HHC (kg/t de pienso)
	Ingesta de pienso [kg/animal/día]	Desviación típica	Ingesta de pienso [kg/animal/día]	Desviación típica	
1	0,563	0,096	0,453	0,066	9
2	0,837	0,162	0,768	0,066	-
3	1,234	0,157	1,201	0,281	18
4	1,317	0,164	1,420	0,314	-

Ejemplo 14: Experimento de alimentación para determinar el efecto de los huesos de cornejo en los parámetros de rendimiento de lechones de cría.

- 5 El efecto positivo de los huesos de cornejo sobre los parámetros de rendimiento de lechones de cría se demostró mediante un experimento de alimentación con harina de hueso de *C. mas* que se había preparado como se describe en el Ejemplo 1.

10 La configuración experimental contenía 2 grupos, un grupo testigo y un grupo de prueba, cada uno constituido por 3 réplicas en 3 cubículos con 10 lechones de cría cada uno. El peso inicial medio del grupo testigo era 8,56 kg ± 0,88 kg, y el de los lechones del grupo de prueba 8,97 kg ± 1,01 kg. El grupo testigo recibió pienso normal para cría de lechones, y el alimento del grupo de prueba contenía adicionalmente 1 kg de harina de hueso de *C. mas* por tonelada de pienso. El grupo testigo recibió desde el día 1 al 14 un pienso de inicio convencional, y desde el día 15 al 42 un pienso de cría convencional. El grupo de prueba recibió desde el día 1 al 14 pienso de inicio y desde el día 15 al 42 pienso de cría, en el que se había mezclado 1 kg de HHC por tonelada de pienso.

- 15 Se pesaron los animales los días 0, 14 y 42. La ingesta de alimento por cubículo se determinó cuando se cambió el alimento y al final del experimento. El grupo de prueba alcanzó al cabo de 14 días un peso vivo significativamente mayor que el grupo testigo. Tras 42 días, la diferencia fue de 2,78 kg, o un poco menos de 10% del peso total del grupo testigo. Este aumento también se refleja en la ganancia diaria de peso y en el aumento de la ingesta de alimento (Tabla 8).

Tabla 8: Efecto de la harina de hueso de *C. mas* en los parámetros de rendimiento de lechones de cría.

Día	Peso vivo [kg]		Valor de p	Días	Ganancia de peso [g/animal/día]		Valor de p	Ingesta de pienso [g/animal/día]		Valor de p
	Grupo testigo	Grupo de prueba			Grupo testigo	Grupo de prueba		Grupo testigo	Grupo de prueba	
0	8,56	8,97	0,265							
14	11,37	12,77	0,010	1-14	201	275	0,001	331	415	0,110
42	28,72	31,50	0,010	1-42	480	537	0,005	823	956	0,008

Ejemplo 15: Experimento de alimentación para determinar el efecto de huesos de cornejo en la aparición de diarrea en lechones de cría.

5 Para evaluar el efecto de los huesos de cornejo en la aparición de diarrea en lechones de cría se llevaron a cabo dos ensayos independientes de alimentación de lechones con harina de hueso de *C. mas* y harina de hueso de *C. officinalis*.

Se llevaron a un establo experimental lechones, el día del destete, de una edad de aproximadamente 4 semanas y, tras una fase de acomodación de tres días, se mezcló en el pienso harina de hueso de cornejo.

10 Durante la duración del experimento se evaluó la intensidad de diarrea por cubículo en un sistema de cuatro niveles: 0 sin diarrea, 1 diarrea leve, 2 diarrea moderada y 3 diarrea intensa. La puntuación media de diarrea de cada grupo corresponde a la intensidad de diarrea diaria promediada aritméticamente en todos los cubículos del grupo. Solamente en caso necesario se llevó a cabo un tratamiento farmacológico con Enteroxid en el cubículo afectado, y exclusivamente cuando la puntuación de diarrea fue mayor que o igual a 2, en caso de diarrea leve mantenida durante más de 3 días o en caso de diarrea leve o grave recurrente.

15 Los parámetros a los que se recurrió para evaluar la aparición de diarrea fueron el promedio de días con diarrea por cubículo, la puntuación media de diarrea por cubículo y el número medio de días de tratamiento medicamentoso requeridos por cubículo. La evaluación de la diarrea se efectuó durante el período en que se presentó diarrea en el establo. Cualquier tratamiento medicamentoso requerido se realizó con Enteroxid.

Experimento de alimentación A: Harina de hueso de *Cornus mas*

20 Sirvió como material de ensayo una harina de hueso de *C. mas* que se había preparado como se describe en el Ejemplo 1.

25 La configuración experimental contenía 2 grupos, un grupo testigo y un grupo de prueba, cada uno constituido por 3 réplicas en 3 cubículos con 10 lechones cada uno. El peso inicial medio del grupo testigo de lechones era 8,10 kg \pm 1,34 kg, y el de los lechones del grupo de prueba 8,11 kg \pm 1,35 kg. El grupo testigo recibió pienso normal para la cría de lechones, y el alimento del grupo de prueba contenía adicionalmente 1 kg de harina de hueso de *C. mas* por tonelada de pienso. La composición del pienso y el programa de alimentación eran análogos a los del Ejemplo 14. La duración del experimento fue de 21 días, ya que solo se observó diarrea entre los días 6 y 19. Los tres cubículos del grupo de prueba solamente mostraron diarrea leve durante 4,33 días y el tratamiento farmacológico con Enteroxid fue necesario solamente en un cubículo. Por el contrario, en el grupo testigo dos cubículos tuvieron que ser tratados con Enteroxid durante seis días después de que apareciese diarrea grave. En el grupo de prueba se observó diarrea significativamente con menor frecuencia y menor gravedad que en el grupo testigo. Con la adición de harina de hueso de *C. mas*, el promedio de días de diarrea por cubículo se redujo en un 28%, de 6,00 a 4,33, la puntuación media de diarrea se redujo en un 53%, de 0,62 a 0,33, y el promedio de días con tratamiento medicamentoso se redujo en un 66%, de 4,00 a 1,33 días.

Experimento de alimentación B: Harina de hueso de *Cornus officinalis*

35 Sirvió como material de ensayo una harina de hueso de *C. officinalis* que se había preparado como se describe en el Ejemplo 1.

40 La configuración experimental contenía 2 grupos, un grupo testigo y un grupo de prueba, cada uno constituido por 3 réplicas en 3 cubículos con 10 lechones cada uno. El peso inicial medio del grupo testigo de lechones era 8,49 kg \pm 1,56 kg, y el de los lechones del grupo de prueba 8,48 kg \pm 1,56 kg. La composición del pienso y el programa de alimentación eran análogos a los del Ejemplo 14. La duración del experimento fue de 21 días, ya que solo se observó diarrea entre los días 6 y 14. La diarrea apareció mucho más raramente en el grupo de prueba que en el grupo testigo, y solo se requirieron 2 días de tratamiento con Enteroxid en el grupo de prueba, en comparación con 8 días en el grupo testigo. Con la adición de harina de hueso de *C. officinalis*, el promedio de días de diarrea por cubículo se redujo en un 61%, de 7,66 a 3,00, la puntuación media de diarrea se redujo en un 36%, de 0,59 a 0,38, y el promedio de días con tratamiento medicamentoso se redujo en un 75%, de 8,00 a 2,00 días.

Ejemplo 16: Experimento de alimentación de lechones de cría con harina de hueso de cornejo y extracto de hueso de cornejo.

Para comparar los efectos de HHC y ESHC, se prepararon estos a partir del mismo material de partida y se realizó un experimento de alimentación en lechones durante 14 días.

50 Sirvió como material de ensayo HHC de *C. mas* que se había preparado por trituración de huesos con un molino de corte dotado de un inserto de tamiz de 1,0 mm. El ESHC se obtuvo por extracción de 20 kg de los huesos de cornejo molidos, utilizando una cuba agitada con 100 l de etanol al 50% durante 24 h, a 25 °C. Después se eliminó el agente de extracción utilizando un evaporador rotatorio a 60 °C y se llevó a sequedad el extracto. Se pudieron obtener 1,63 kg de extracto seco a partir de la cantidad de materia prima utilizada (relación de droga a extracto (RDE) = 55 aprox. 12:1).

5 Para la prueba de alimentación se dividieron los lechones en 3 grupos de 3 cubículos con 10 lechones cada uno. El grupo 1 recibió un pienso para lechones convencional sin aditivos, el grupo 2 recibió además HHC (proporción de mezcla 1.000 g por tonelada de pienso terminado) y el grupo 3 recibió además ESHC (proporción de mezcla 83 g por tonelada de pienso terminado). La proporción de mezcla del ESHC para el grupo 3 se eligió de modo que correspondiese con la de la HHC en el grupo 2 (con una RDE de 12:1).

Todos los lechones fueron tratados profilácticamente con Enteroxid y no se presentó ningún caso de diarrea, por lo que en este ensayo no se puede hacer ninguna afirmación sobre el efecto de los productos ensayados sobre la diarrea.

10 El Grupo 2 (HHC) y el Grupo 3 (ESHC) muestran una tasa de crecimiento diario más alta, una ingesta de alimento mejorada y una tasa de conversión del alimento claramente mejorada en comparación con el grupo testigo (Tabla 9).

Tabla 9: Resultados de un ensayo de alimentación con HHC (Grupo 2), ESHC (Grupo 3) y sin aditivos (testigo, Grupo 1).

Parámetro	Grupo	Valor medio
Ganancia diaria (GD) de peso [g/lechón/día]	1	254
	2	276
	3	280
Ingesta de pienso (IP) [g/lechón/día]	1	430
	2	439
	3	445
Tasa de conversión del alimento [IP / GD]	1	1,70
	2	1,60
	3	1,59

Ejemplo 17: Experimentos de campo con lechones de destete

15 Para evaluar el efecto de los huesos de conejo sobre el rendimiento de lechones de cría en el funcionamiento normal de una explotación, se realizó un experimento de campo con 240 lechones de destete.

Sirvió como material de ensayo una harina de hueso de *C. mas* que se había preparado como se describe en el Ejemplo 1.

20 Se dividieron los animales en 4 grupos a razón de 60 lechones cada uno, teniendo dos grupos un peso inicial más bajo y dos grupos un peso inicial más alto. A uno de los grupos con un peso inicial más bajo y a uno de los grupos con un peso inicial más bajo más alto se les mezcló en la alimentación, como aditivo, harina de hueso de *C. mas*. La proporción de mezcla fue de 3,0 kg por tonelada de pienso de inicio convencional. Los dos grupos restantes sirvieron como grupos testigo. Todos los grupos recibieron Enteroxid de forma profiláctica. Se determinó el peso total medio de cada uno los grupos al comienzo y al final del experimento, cuando habían transcurrido 14 días (Tabla 10).

25 El efecto de la harina de hueso de *C. mas* sobre el peso corporal fue claro. El aumento fue de 68% para los lechones con un peso inicial más bajo y de 16% para los lechones con un peso inicial mayor, en cada caso referido a los grupos testigo.

Tabla 10: Efecto de la harina de hueso de *C. mas* (3 kg por tonelada de pienso terminado) sobre el peso vivo de lechones de destete en un experimento de campo.

Peso vivo por lechón [kg]	Grupo testigo ligero	Grupo experimental ligero	Grupo testigo pesado	Grupo experimental pesado
Día 0	7,97	7,90	8,60	8,63
Día 14	9,20	9,97	12,53	13,20

30

Ejemplo 18: Experimento de alimentación en pollos de engorde

35 Para evaluar el efecto de los huesos de conejo sobre los parámetros de rendimiento de aves de corral, se realizó un experimento de alimentación en pollos con harina de hueso de *C. mas*. Para ello, se dividieron 420 pollitos Ross en tres grupos de prueba, cada uno en 7 cubículos con, respectivamente, 20 pollitos. El grupo testigo recibió pienso para pollos ordinario, y los dos grupos de prueba recibieron adicionalmente harina de hueso de *C. mas* como aditivo del pienso en una proporción de mezcla de 1,0 kg por tonelada (Grupo de prueba 1) y 0,5 kg por tonelada (Grupo de prueba 2). Se criaron los pollos durante un período de 35 días y se les pesó en los días 0, 14 y 35.

5 En las Tablas 12 y 13 se representan los parámetros de rendimiento peso vivo, ingesta de pienso y tasa de conversión del alimento. En ambas proporciones de mezcla, la alimentación con harina de hueso de *C. mas* incrementó claramente el peso vivo de los pollos de engorde en comparación con el grupo testigo, sin diferencias significativas entre los grupos de prueba. La ingesta de pienso en los grupos de prueba fue menor que en el grupo testigo. La ganancia de peso vivo con un menor consumo de pienso conduce a una clara mejora en la tasa de conversión de alimento de los grupos de prueba en comparación con el grupo testigo. La tasa de conversión de alimento al cabo de 35 días fue 1,86 kg/kg (kg de pienso/kg de peso vivo) en el grupo testigo, 1,74 kg/kg en el Grupo de prueba 1 y 1,79 kg/kg en el Grupo de prueba 2.

Tabla 11: Efecto de la harina de hueso de *C. mas* sobre el peso vivo medio de pollos de engorde.

Día	Grupo testigo [g]	Grupo de prueba 1 [g]	Grupo de prueba 2 [g]
0	37 ± 0,80	37 ± 0,75	37 ± 0,92
14	321 ± 24,25	328 ± 24,65	334 ± 12,28
35	1.798 ± 302,62	1.871 ± 320,30	1.864 ± 268,11

10

Tabla 12: Efecto de la harina de hueso de *C. mas* sobre la ingesta media de pienso y la tasa de conversión del alimento en pollos de engorde durante un período de observación de 35 días.

Grupo	Ingesta de pienso [g]	Tasa de conversión del alimento [kg/kg]
Grupo testigo	3.270 ± 231,50	1,86 ± 0,15
Grupo de prueba 1	3.193 ± 280,69	1,74 ± 0,09
Grupo de prueba 2	3.255 ± 117,70	1,79 ± 0,11

15 Ejemplo 19: Caracterización del extracto seco de hueso de cornejo mediante identificación y cuantificación de constituyentes seleccionados, por medio de espectrometría de masas

Se prepararon extractos etanólicos secos de hueso de cornejo a partir de huesos de *C. mas* y de *C. officinalis*, como se describe en el Ejemplo 1. Agente de extracción: proporción 1:5 (v/v) de harina de hueso:mezcla de etanol-agua con 70% en volumen de etanol, tiempo de extracción: 24 h.

20 Se prepararon extractos acuosos secos de hueso de cornejo a partir de huesos de *C. mas* y *C. officinalis*, como se describe en el Ejemplo 1. Agente de extracción: proporción 1:5 (v/v) de harina de hueso:agua pura, tiempo de extracción: 24 h.

25 Las mediciones se realizaron conforme al método descrito en METLIN (Smith, O'Maille *et al.* 2005; Zhu, Schultz *et al.* 2013) mediante cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo con electrospray (LC-ESI-TOF-MS, por sus siglas en inglés) para poder comparar los tiempos de retención de las sustancias depositados en la base de datos METLIN (MDB, <http://metlin.scripps.edu/index.php>) con las propias mediciones.

30 La identificación de las sustancias se realizó utilizando dos criterios independientes: la masa exacta (ME) y el tiempo de retención. A partir de la masa exacta (en Da/mol, con 4 decimales, precisión de la masa +/- 2 ppm) se determinó una fórmula empírica (Mass Profiler Professional Software, Agilent). Se comparó esta fórmula empírica con la base de datos METLIN, en la que también se han depositado fórmulas estructurales para las fórmulas moleculares correspondientes y, con ello, nombres de sustancias. Si el tiempo de retención coincidía con el de la base de datos, se consideró identificada la sustancia. Para las sustancias ácido gálico, ácido elágico y pentagaloíglucosa se determinaron adicionalmente los tiempos de retención exactos mediante inyección de patrones auténticos (PA).

35 Los constituyentes presentes en los extractos o los huesos (suponiendo una extracción exhaustiva) fueron cuantificados por las áreas de sus picos. Sirvieron como referencia, por una parte, sustancias de referencia de ácido gálico (1 mg/ml, Sigma G7384), ácido elágico (al 95%, 0,1 mg/ml, Sigma 2250) y pentagaloíglucosa (1 mg/ml, Sigma G7548) y, por otro lado, el área total de los picos del cromatograma para loganina y dihidroquercetina.

40 En las Tablas 13 y 14 se ofrece la identificación y cuantificación de los componentes de *C. mas* seleccionados, a modo de ejemplo, para un extracto etanólico y uno acuoso. No obstante, el análisis de ESHC de *C. officinalis* arrojó valores de medida casi idénticos, por lo que la composición de ambos ESHC puede considerarse equivalente.

Tabla 13: Constituyentes de un ESHC de *C. mas* preparado por extracción con etanol al 70%. La relación de droga a extracto (RDE) fue 12:1. Las mediciones se realizaron con repetición por triplicado.

ESHC Constituyente	ME (Da/mol)	Contenido (mg por kg de ESHC)	Contenido (mg por kg de harina de hueso)	Identificación
Ácido gálico	170,1195	769,2	64,1	PA
Ácido elágico	302,1926	10.384,8	865,4	PA
Pentagaloíglucosa	940,6772	5.088	424,0	PA
Loganina*	390,3823	519,9	43,3	MDB
Dihidroquercetina*	304,2516	172,8	14,4	MDB
* La cuantificación del contenido se realizó suponiendo que todas las sustancias del extracto de hueso contribuyen al área total de picos.				

- 5 Sorprendentemente, en la extracción con 100% de etanol se identificaron esencialmente los mismos constituyentes, y sus contenidos en el extracto eran también casi idénticos a los del extracto en etanol al 70%.

Tabla 14: Constituyentes de un ESHC de *C. mas*, preparado por extracción con 100% de agua. La relación de droga a extracto (RDE) fue 9,8:1. Las mediciones se realizaron con repetición por triplicado.

ESHC Constituyente	ME (Da/mol)	Contenido (mg por kg de ESHC)	Identificación
Ácido gálico	170,1195	690,1	PA
Ácido elágico	302,1926	5.736,4	PA
Pentagaloíglucosa	940,6772	n. d.	PA
Loganina*	390,3823	532,4	MDB
Dihidroquercetina*	304,2516	10,5	MDB
n. d. ... no detectable			
* La cuantificación del contenido se realizó suponiendo que todas las sustancias del extracto de hueso contribuyen al área total de picos.			

Ejemplo 20: Comparación del efecto antibacteriano de constituyentes puros en comparación con ESHC

- 10 Tal como se describe en los Ejemplos 3 y 4, la CIM50 de un extracto seco de hueso de conejo *C. mas* en etanol al 70% en volumen, sobre la cepa bacteriana enteropatógena *E. coli* O128:H2, se sitúa entre 78 y 156 mg/l, y la CIM50 del extracto en agua pura se sitúa entre 156 y 313 mg/l. Las investigaciones de las sustancias puras ácido gálico, ácido elágico, pentagaloíglucosa y loganina en la misma disposición experimental mostraron en cada caso una CIM50 >500 mg/l.

- 15 De estos resultados se deduce claramente que ninguno de los constituyentes identificados es responsable por sí solo de las extraordinariamente buenas propiedades antibacterianas del ESHC.

- 20 Sorprendentemente, estos resultados muestran claramente que la sustancia constituyente pentagaloíglucosa, conocida en los huesos, no contribuye significativamente al efecto antibacteriano, ya que los extractos etanólicos y acuosos presentan aproximadamente las mismas concentraciones inhibitorias mínimas para *E. coli* O128:H2, *S. typhimurium* y toxina A de *C. perfringens* (véase el Ejemplo 4), pero la sustancia pentagaloíglucosa solo se encuentra en los extractos etanólicos, debido a su insolubilidad en agua.

Ejemplo 21: Comparación cromatográfica de ESHC de *C. mas* y *C. officinalis* de distinta procedencia

- 25 Los cinco extractos secos de hueso de conejo del Ejemplo 3 se analizaron mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC, por sus siglas en inglés), que estaba acoplada a un detector de matriz de diodos (DAD). Esto permite representar en un cromatograma todas las sustancias visibles en el DAD. La comparación de los cromatogramas HPLC-DAD proporciona información sobre cuán similar es la composición de muestras individuales.

Se usó como HPLC el siguiente equipo: desgasificador G1379B, muestreador automático G1329B, bomba binaria G1312A (serie 1100), compartimento de columna termostaticado G1316A, celda de flujo estándar G1315D 018.

5 Sirvió como detector un detector de matriz de diodos G1315D (serie 1200). Se utilizó como columna una Agilent Zorbax Sb-Aq de 250x4,6 mm. El disolvente A era agua con 0,1% de ácido fórmico y el disolvente B era acetonitrilo con 0,1% de ácido fórmico. Se empleó el siguiente gradiente para separar las sustancias: 0,00 min (10% de B); 47,00 min (22% de B); 50,00 min (25% de B), 51,00 min (100% de B); 55,00 min (100% de B); 56,00 min (10% de B); 60,00 min (10% de B). El volumen de inyección fue 20 µl, el caudal 1 ml/min y la temperatura 25 °C. El DAD registró las siguientes longitudes de onda individuales: 220 nm, 254 nm, 280 nm, 320 nm, 350 nm, 580 nm, así como todo el espectro de 190 nm a 900 nm.

10 En la Figura 1 se muestra una vista conjunta de los cinco cromatogramas de HPLC-DAD. En ella se aprecia claramente que no existen diferencias significativas en la composición de los huesos de distintas procedencias (Austria, Alemania, Turquía) y especies (*C. mas* y *C. officinalis*). Por lo tanto, las composiciones químicas de los extractos de hueso de conejo de procedencias y especies distintas no difieren significativamente entre sí.

Ejemplo 22: Caracterización de la composición de harina de hueso de conejo

15 Mediante un análisis ampliado de Weende para piensos y para elementos traza, de acuerdo con la VDLUFA (Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. Methodenbuch (El análisis químico de los alimentos. Libro de métodos). volumen III. VDLUFA-Verlag, 2007) se caracterizaron con más detalle las cinco diferentes harinas de hueso de conejo de los Ejemplos 3 y 21, de distintas procedencias y especies. En la Tabla 15 se resumen los valores medios, así como los valores máximos y mínimos, de los respectivos parámetros de medida. Las composiciones de las distintas harinas de hueso de conejo son muy similares y, por lo tanto, pueden considerarse equivalentes.

20 Tabla 15: Caracterización de HHC mediante análisis ampliado de Weende. Se analizaron cinco muestras de distinta procedencia. Todos los valores se refieren a 100% de materia seca (MS), salvo el propio valor de MS, que se refiere a la materia fresca.

	Valor medio [g por kg]	Máximo [g por kg]	Mínimo [g por kg]
Materia seca	918	877	942
Ceniza bruta	14,7	11,0	16,0
Proteína bruta	41,2	36,0	48,0
Grasa bruta	57,3	49,0	67,0
Almidón	10,0	11,3	8,9
Azúcar	11,0	11,9	10,1
Fibra bruta	556	485	598
Extracto libre de nitrógeno	330	293	361
Fibra en detergente neutro	711	646	752
Fibra en detergente ácido	524	457	558
Lignina en detergente ácido	232	198	250
Ca	4,1	3,8	4,2
P	1,1	0,9	1,4
Mg	0,6	0,5	0,9
K	1,4	1,0	2,3
Na	0,2	0,1	0,3
Fe	37,3	34,4	40,9
Mn	5,2	4,3	6,9
Zn	19,5	15,1	25,1
Cu	7,0	5,3	8,8

REIVINDICACIONES

- 5 1. Aditivo para piensos, alimentos, agua potable o preparaciones farmacéuticas, preparado a partir de al menos una especie de cornejo, en particular *Cornus mas*, *Cornus officinalis*, *Cornus chinensis* o *Cornus eydeana*, caracterizado por que están contenidos al menos un componente seleccionado de harina de hueso de cornejo y/o extracto de hueso de cornejo y, además, al menos una sustancia adicional obtenida por síntesis química y/o fermentación microbiana, seleccionada de formiato de calcio, ácido benzoico, ácido ascórbico, ácido fórmico o vitamina B12, y eventualmente al menos un componente seleccionado de materiales vehiculantes, sustancias auxiliares de formulación y/o componentes biológicamente activos.
- 10 2. Aditivo según la reivindicación 1, caracterizado por que la especie de cornejo utilizada es al menos una de *Cornus mas* y *Cornus officinalis*.
3. Aditivo según una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que la harina de hueso de cornejo presenta tamaños de grano de 50 µm a 5 mm, preferiblemente de 100 µm a 2 mm.
- 15 4. Aditivo según las reivindicaciones 1, 2 o 3, caracterizado por que la harina de hueso de cornejo está contenida en el pienso en una concentración de hasta 20 kg/t, preferiblemente en un intervalo de 0,1 kg/t a 10 kg/t, de manera particularmente preferible en un intervalo de 0,5 kg/t a 5 kg/t.
5. Aditivo según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el extracto de hueso de cornejo es un extracto acuoso de hueso de cornejo, un extracto orgánico de hueso de cornejo, un extracto acuoso/orgánico de hueso de cornejo o un extracto seco de hueso de cornejo preparado a partir de estos.
- 20 6. Aditivo según la reivindicación 5, caracterizado por que el extracto de hueso de cornejo contiene, por kilogramo, entre 70 mg y 7.000 mg, preferiblemente entre 350 mg y 1.500 mg, de ácido gálico y/o entre 600 mg y 100.000 mg, preferiblemente entre 2.500 mg y 20.000 mg, de ácido elágico y/o entre 50 mg y 5.000 mg, preferiblemente entre 250 mg y 1.000 mg, de loganina y/o entre 1 mg y 2.000 mg, preferiblemente entre 5 mg y 350 mg, de dihidroquercetina.
- 25 7. Aditivo según la reivindicación 5 o 6, caracterizado por que el extracto de hueso de cornejo está contenido en el pienso en una concentración de hasta 10 kg/t, preferiblemente en un intervalo de 1 g/t a 5 kg/t, de manera particularmente preferible en un intervalo de 5 g/t a 1 kg/t.
- 30 8. Aditivo según una de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que comprende al menos otro componente tal como una sustancia auxiliar de formulación, tal como otro componente vegetal procedente de al menos una especie de cornejo, seleccionado del grupo de pulpa del fruto, hojas, corteza, tallo, flores y raíces y/o, como material vehiculante, un material vehiculante fisiológicamente aceptable, preferiblemente maltodextrina, ciclodextrina, carbonato de calcio, almidón, sulfato de disodio, talco, sacarosa, bentonitas y/o zeolitas; un componente para piensos tal como cereal; subproductos de la elaboración de cereal tales como bagazo de destilería o cervecería seco; maíz, trigo, salvado de trigo, arroz, salvado de arroz, ensilados, aceites o grasas de origen vegetal o animal, minerales y/o vitaminas y/o un componente biológicamente activo seleccionado del grupo de probióticos, prebióticos,
- 35 enzimas para piensos, levaduras, componentes de levadura, ácidos, preferiblemente ácidos orgánicos o sus sales; fitógenos; constituyentes vegetales inmunoestimulantes o bioactivos y sustancias desactivantes de micotoxinas.
9. Aditivo según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que está contenido al menos un agente adicional para la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades diarreicas y/o trastornos digestivos.
- 40 10. Aditivo según la reivindicación 9, caracterizado por que el agente adicional para la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades diarreicas se selecciona del grupo de antibióticos, coccidiostáticos, Enteroxid y óxido de zinc.
- 45 11. Harina de hueso de cornejo y/o extracto de hueso de cornejo procedentes de al menos una especie de cornejo, en particular *Cornus mas*, *Cornus officinalis*, *Cornus chinensis* o *Cornus eydeana* y, además, al menos una sustancia adicional obtenida por síntesis química y/o fermentación microbiana, seleccionada de formiato de calcio, ácido benzoico, ácido ascórbico, ácido fórmico o vitamina B12, así como eventualmente al menos un componente seleccionado de materiales vehiculantes, sustancias auxiliares de formulación y/o componentes biológicamente activos, para uso en la profilaxis y/o tratamiento de enfermedades diarreicas, en particular en la ganadería.

Fig. 1

