



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020001475-3 A2



(22) Data do Depósito: 23/07/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 08/09/2020

(54) Título: USO DE SOFOROLIPÍDEOS COMO ADITIVO PARA RAÇÃO

(51) Int. Cl.: A61K 31/7028; A23K 50/75.

(30) Prioridade Unionista: 25/07/2017 EP 17183140.7; 25/07/2017 US 62/536,821.

(71) Depositante(es): DSM IP ASSETS B.V..

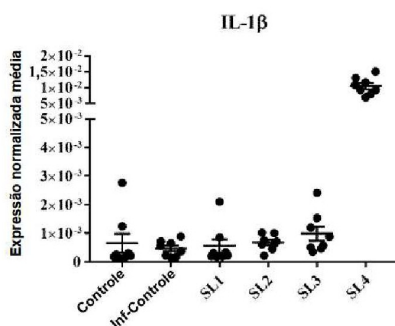
(72) Inventor(es): CHRISTOPHER MICHAEL BUTT; PIETRO CELI; NORMAN SALEM.

(86) Pedido PCT: PCT EP2018069946 de 23/07/2018

(87) Publicação PCT: WO 2019/020578 de 31/01/2019

(85) Data da Fase Nacional: 23/01/2020

(57) Resumo: A invenção se refere a métodos para modulação da flora intestinal e/ou para reforçar a função de sistema imunológico em animais compreendendo a administração de um ou mais sofrorolipídeos a um animal com necessidade dos mesmos. Também são fornecidas composições de ração animal que compreendem sofrorolipídeos.



“USO DE SOFOROLIPÍDEOS COMO ADITIVO PARA RAÇÃO”**ANTECEDENTES**

[0001] A presente invenção se refere a composições de aditivo para ração que contêm um ou mais soforolipídeos e um método para a modulação da flora intestinal e/ou para apoiar a função de sistema imunológico em animais que compreendem a administração de um ou mais soforolipídeos a um animal com necessidade dos mesmos. Mais particularmente, a presente invenção se refere a um método para tratar ou impedir a coccidiose e doenças causadas por clostridium sp. com um ou mais soforolipídeos. A invenção também se refere a composições de aditivo para ração ou pré-mistura para ração que compreendem pelo menos um soforolipídeo.

[0002] O termo ração ou composição de ração significa qualquer composto, preparação, mistura, ou composição adequada para, ou destinada à ingestão por um animal.

[0003] O termo animal inclui todos os animais. Os exemplos de animais são não ruminantes e ruminantes. Os animais ruminantes incluem, por exemplos, animais, como ovelha, cabra e gado, por exemplo, vaca, como gado para consumo de carne e vacas leiteiras. Em uma modalidade particular, o animal é um animal não ruminante. Os animais não ruminantes incluem animais de estimação, por exemplo cavalos, gatos e cachorros; animais monogástricos, por exemplo, porco ou suínos (que incluem, porém sem limitação, leitões, porcos em crescimento e porcas); aves, como perus, patos e galinhas (que incluem, porém sem limitação, frangos de corte, galinhas); peixes (que incluem, porém sem limitação, salmão, truta, tilápia, peixe-gado e carpa); e

crustáceos (que incluem, porém sem limitação, camarão e camarão grande).

[0004] Os soforolipídeos são compostos de glicolipídeos de superfície ativa que podem ser sintetizados por um número seleta de espécies de leveduras não patogênicas. Os soforolipídeos consistem em uma cauda hidrofóbica de ácido graxo de 16 ou 18 átomos de carbono e uma cabeça hidrofílica de carboidrato, soforose. A soforose é um dissacarídeo de glicose com uma ligação β -1,2 incomum e pode ser acetilado nas posições 6' e/ou 6". Um ácido graxo hidroxilado terminal ou subterminal é β -glicosidicamente ligado à molécula de soforose. A extremidade carboxílica desse ácido graxo é livre (forma ácida ou aberta) ou internamente esterificada na posição 4" ou, em alguns casos, na posição 6' ou 6" (forma lactônica). O próprio ácido graxo de hidroxila conta, em geral, 16 ou 18 átomos de carbono e pode ter uma ou mais ligações insaturadas.

[0005] Devido a sua biodegradabilidade e baixa ecotoxicidade, o uso de soforolipídeos como biotensoativos em aplicações industriais tem sido cada vez mais explorado.

[0006] Os presentes inventores constataram agora de modo surpreendente que os soforolipídeos têm um grande potencial para uso em ração animal. Em particular, foi constatado que uma composição que compreende pelo menos um soforolipídeo especificado abaixo no presente documento pode ser usada para alívio, cura ou prevenção de coccidiose e de doenças causadas por clostridium sp.

[0007] A solução para esse problema técnico é fornecida pelas modalidades caracterizadas nas reivindicações.

[0008] BREVE SUMÁRIO

[0009] A presente invenção se refere a soforolipídeos como componentes de ração animal ou aditivos de ração, bem como a composições, aditivos de ração e ração que contém os mesmos. Em uma modalidade preferencial, o um ou mais soforolipídeos são administrados por via oral. O um ou mais soforolipídeos pode estar na forma de um aditivo para composição de ração. Em uma outra modalidade, o um ou mais soforolipídeos são adicionados a uma pré-mistura para produto de ração.

[0010] Portanto, a presente invenção fornece o uso dos ditos compostos como componentes de ração animal ou aditivos de ração.

[0011] A invenção fornece adicionalmente o uso desses compostos da mesma para a preparação de composições que melhoram o desempenho em animais, especialmente que têm atividade como moduladores da microflora gastrointestinal e que são aplicáveis através da ração animal.

[0012] A presente invenção se refere adicionalmente ao uso de soforolipídeos como definido acima no presente documento na fabricação de ração animal ou aditivo animal para ração para alívio, cura ou prevenção de coccidiose e doenças causadas por *clostridium* sp - particularmente *clostridium perfringens* - em animais, como aves.

[0013] Por fim, a presente invenção fornece aditivos de ração animal com base em um composto de soforolipídeo de acordo com a invenção.

[0014] O termo "intestino" como usado no presente documento designa o trato gastrointestinal ou digestivo (também referido como canal alimentar) e se refere ao sistema de órgãos dentro de animais multicelulares que

ingerem alimentos, digerem os mesmos para extrair energia e nutrientes e expõem os resíduos restantes.

[0015] O termo "microflora" intestinal como usado no presente documento se refere a culturas microbianas naturais que residem no intestino e à manutenção da saúde, auxiliando na digestão apropriada e/ou apoiando a função de sistema imunológico.

[0016] O termo "modular" como usado no presente documento em conexão com a microflora intestinal significa, em geral, alterar, manipular, alterar ou ajustar a função ou situação da mesma em um animal saudável e normalmente funcional, isto é, um uso não terapêutico.

[0017] Coccidia é um nome genérico dado a organismos protozoários de célula única que são parasitas intestinais que infectam tanto vertebrados e invertebrados. Os organismos causam coccidiose e usualmente se assentam no intestino delgado, como o cólon. A infecção com coccidia para animais de fazenda não pode apenas reduzir o crescimento, mas também pode ser fatal. Os sintomas provenientes da infecção coccidial incluem perda de células epiteliais, o desnudamento da mucosa intestinal e diarreia (frequentemente com uma perda concomitante de sangue). Para alguns animais de fazenda, como aves, a infecção coccidial pode ser fatal, se não prejudicar seriamente a saúde do animal.

[0018] As aves são particularmente vulneráveis a coccidiose devido a várias razões: (1) O ciclo parasítico de 6 a 8 dias atinge os mesmos em um estágio crítico entre a semana 2 e a semana 4, quando o crescimento máximo é usualmente expressado. Visto que os parasitas destroem

virtualmente todo o epitélio intestinal, a absorção de nutrientes é dramaticamente reduzida, o que resulta em uma acentuada depressão de crescimento. Até o abate em 5 ou 6 semanas, não há tempo suficiente para se recuperar;(2) Há 7 espécies de Eimeria que podem infectar aves, mais que em qualquer outra categoria animal e pelo menos 4 das mesmas são regularmente vistas em operações comerciais. Assim, quando um ciclo infeccioso é concluído, um outro já pode estar em um estágio precoce de modo que coccidiose se torne crônica; (3) Em aves, observa-se a maioria das espécies patogênicas (Eimeria tenella, E. necatrix), que induzem hemorragias graves e, em certos casos, pode causar uma mortalidade de até 50 %. Tal caso agudo de coccidiose poderia facilmente destruir um avicultor; e(4) A criação intensiva de aves (100.000 pintos ou mais em um alojamento) em grandes ninhadas facilita o acesso de aves em estágios infecciosos de coccidia nas fezes através de coprofagia e, assim, apoia uma rápida disseminação da doença por toda uma manada de aves. Se as condições sanitárias não forem rigorosas, a doença também se transferirá para outros alojamentos de aves na mesma fazenda e permanecerá no local por anos.

[0019] A fim de combater coccidiose, as rações animais são frequentemente suplementadas com um coccidiostato. Os coccidiostatos que foram aprovados por EEC para uso com aves (galinhas, perus, aves e galinhas poedeiras) incluem sulfonimidas, amprolium, decoquinato e ionóforos. No entanto, alguns desses coccidiostatos são compostos inorgânicos que não são naturais e, assim, precisam ser sinteticamente produzidos. Isso significa que são

relativamente dispendiosos. Portanto, há uma necessidade de coccidiostatos que ocorrem naturalmente.

[0020] As doenças causadas por *Clostridium* sp são comuns em estoques de animal de aves, porcos, coelhos e ratos. Há, por exemplo, uma ligação entre a enterite necrótica da doença e a presença de *Clostridium perfringens*. A enterite necrótica é caracterizada por inflamação grave e descamação do trato intestinal e geralmente ocorre em conjunto com a coccidiose.

[0021] Muitos artigos revelaram que a quantidade de *Clostridium perfringens* nos tratos digestivos tem um impacto considerável na saúde e na taxa de crescimento de um frango de corte. Os sintomas típicos de aves infectadas são; Penas despenteadas, depressão perceptível, perda de apetite, excrementos soltas/escorrendo ou diarreia e uma relutância acentuada em se mover. Os exemplos de tais artigos são B.S. Bains (1979) "A manual for poultry diseases" (Ed. Roche, Basel Switzerland); B Köhler, K Vogel and P Starost (1979) "Nekrotisierende und Ulzerative Enteritis bei Hühnern der Mast- und Legerichtung unter Bedingungen industriemässiger Geflügelproduktion" (Mh. Vet.-Med., 32, 704-711); B Köhler, K Vogel, W Witte e H Kühn (1983) "Vergleich der Ursachen von Hospitalismus durch *Cl. perfringens*, *Staphylococcus aureus* und *Salmonellen* unter den Bedingungen der industriemässigen Geflügelproduktion und Möglichkeiten ihrer Bekämpfung", (V. Intern. Tierhyg. Symposium, 25 und 26.05.93, Leipzig, Sammelband der Vorträge, Veterinärmedizinische Fakultät Leipzig); Th. Vissienon, U Johannsen and B Köhler (1994) "Untersuchungen zur Pathologie und Pathogenese der

Clostridium perfringens-Typ-A-Enterotoxämie des Huhnes. 1. Versuche zur experimentellen Erzeugung der Krankheit, Versuchsansatz, klinisches Bild und Morbiditätsraten", (Mh. Vet.-Med., 49, 23-28); Th. Vissienon, U Johannsen, M Solveig and B Köhler (1994) "Untersuchungen zur Pathologie und Pathogenese der Clostridium-perfringens-Typ-A-Enterotoxämie des Huhnes. 2. Pathomorphologische und bakteriologische Befunde nach experimenteller intraduodener Cl.-perfringens-Typ-A-Infektion" (Sporen und vegetative Keime) und Toxinapplikation (Mh. Vet.-Med., 49, 93-102).

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0022] Antes que a revelação em questão seja adicionalmente descrita, deve-se compreender que a revelação não é limitada às modalidades particulares da revelação descrita abaixo, já que variações das modalidades particulares podem ser feitas e ainda estarem dentro do escopo das reivindicações anexas. Também deve ser entendido que a terminologia empregada tem uma finalidade de descrever modalidades particulares e não se destina a ser limitativa. Em vez disso, o escopo da presente revelação será estabelecido pelas reivindicações anexas.

[0023] Ao longo do presente relatório descritivo e das reivindicações anexas, as palavras "compreender", "incluir" e "ter" e variações como "compreende", "compreendendo", "inclui" e "incluindo" devem ser interpretadas inclusivamente. Ou seja, essas palavras são destinadas a expressar a possível inclusão de outros elementos ou números inteiros não especificamente citados, onde for permitido pelo contexto.

[0024] Neste relatório descritivo e nas reivindicações anexas, as formas singulares "um", "uma", "a" e "o" incluem várias referências a menos que o contexto indique claramente o contrário. A título de exemplo, "um soforolipídeo" pode significar um soforolipídeo ou mais que um soforolipídeo.

[0025] A menos que seja definido de outro modo, todos os termos técnicos e científicos usados no presente documento têm o mesmo significado que aquele comumente entendido por um indivíduo de habilidade comum na técnica a que esta revelação pertence.

[0026] Os soforolipídeos contêm uma cauda de ácido graxo e uma fração de carboidrato, soforose, que é um dissacarídeo de glicose com uma ligação 1,3-2. A cauda de ácido graxo é β -glicosidicamente ligada à molécula de soforose. A extremidade carboxílica desse ácido graxo pode ser livre (a forma ácida ou aberta) ou internamente esterificada na posição 4' ou na posição 6' ou 6" (a forma lactônica). A cauda de ácido graxo pode ter de 2 a 24 átomos de carbono. Em geral, a cauda de ácido graxo tem 16 ou 18 átomos de carbono e pode ter uma ou mais ligações insaturadas. Para visões gerais e terminologias gerais referentes a soforolipídeos, consultar Van Bogaert *et al*, *Appl Microbiol Biotechnol* (2007) 76:23-34; Van Bogaert *et al*, *Process Biochemistry* (2011) 46:821-833; e Lang *et al*, *Fat Sci. Technol.* 1989 (91), vol. 9, 363-366. O documento WO2004/044216 se refere a propriedades antimicrobianas de soforolipídeos e seu uso.

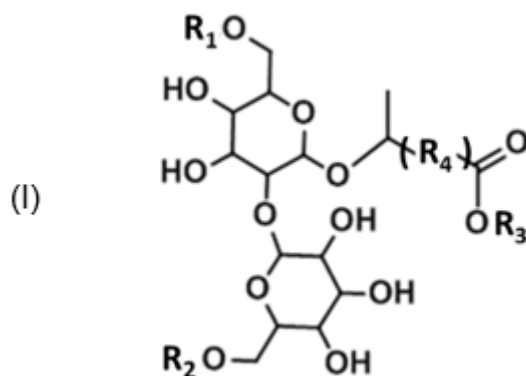
[0027] Os soforolipídeos podem ser naturalmente produzidos por certos tipos de cepas de levedura,

notavelmente *Starmerella bombicola* (também referido como *Candida bombicola*) e *Candida apicola*. Tais soforolipídeos são referidos como soforolipídeos naturais. Os documentos WO2004/044216 e WO2012/080116 descrevem a fermentação de soforolipídeos naturais em *C. bombicola*. O documento WO2012/080116 também descreve o isolamento de soforolipídeos. Tais soforolipídeos podem ser usados em um método da invenção. Com base em qualquer uma dessas publicações, a pessoa versada entende como produzir tais soforolipídeos.

[0028] O termo "soforolipídeos" no presente documento também abrange soforolipídeos modificados. Bisht *et al* (J. Org. Chem. 1999, 64:780-789) descreve acilação mediada por enzima e esterificação de soforolipídeos. O documento WO2004/044216 descreve a síntese química de vários soforolipídeos modificados. Asmer *et al* (Journal of the American Oil Chemists' Society (1988), vol. 65, nº 9, 1460-1466) revela a produção microbiana de soforolipídeos. Os soforolipídeos também podem ser quimicamente modificados. O documento WO2006/069175 revela vários soforolipídeos modificados. A fração de carboidrato pode ser alquilada, por exemplo, nas posições 6' e/ou 6". Por exemplo, as posições 6' e 6'' podem ser acetiladas. A posição 6' é idêntica à posição 6'' exceto pelo fato de que a posição 6' está próxima da cauda de ácido graxo. Tais soforolipídeos modificados podem ser usados em um método da invenção. Com base em qualquer uma dessas publicações, a pessoa versada entende como produzir soforolipídeos modificados.

[0029] Em algumas modalidades, o soforolipídeo pode estar na forma de um éster ou ácido livre do mesmo. O

soforolipídeo pode ser um soforolipídeo de fórmula (I), em que R_1 e R_2 são, independentemente, H ou acetila; R_3 é um grupo $C_1 - C_8$ alquila; e R_4 é uma unidade de alcano linear, ramificada, saturada ou insaturada, que compreende de 6 a 24 átomos de carbono.



[0030] R_1 pode ser H ou acetila.

[0031] R_2 pode ser H ou acetila.

[0032] R_3 pode ser metila; etila; propila ou isopropila; n-butila ou isobutila; n-pentila, isopentila, *terc*-pentila, 2,2-dimetilpropila; n-hexila, 2-metilpentila, 3-metilpentila, 2,2 di-metilbutila, ou 2,3 di-metilbutila; n-heptano, 2-metil-hexano, 3-metil-hexano, 2,2-dimetilpentano, 2,3- dimetilpentano, 2,4-dimetilpentano, 3,3-dimetilpentano, 3-etilpentano, ou 2,2,3-trimetilbutano; n-octila, 2-metil-heptano, 3-metil-heptano, 4-metil-heptano, 3-etil-hexano, 2,2-dimetil-hexano, 2,3-dimetil-hexano, 2,4-dimetil-hexano, 2,5-dimetil-hexano, 3,3-dimetil-hexano, 3,4-dimetil-hexano, 3-etil-2-metilpentano, 3-etil-3-metilpentano, 2,2,3-trimetilpentano, 2,2,4-trimetilpentano, 2,3,3-trimetilpentano, 2,3,4-trimetilpentano, ou 2,2,3,3-tetrametilbutano.

[0033] Em uma modalidade preferencial, R_3 é um alquil

éster. Em uma modalidade preferencial, o alquil éster é um grupo etila ou um grupo butila.

[0034] R₄ pode ser linear ou ramificado. R₄ pode ser completamente saturado ou pode ter uma ou mais ligações duplas carbono-carbono. R₄ forma parte da cauda de ácido graxo do soforolipídeo. Um R₄ preferencial tem 15 átomos de carbono. Um exemplo de uma cauda de ácido graxo que tem 18 átomos de carbono é oleato. O ácido eicosapentaenoico (EPA) é uma outra cauda de ácido graxo adequada. Uma cauda de ácido graxo preferencial é 9-octadecenoato.

[0035] Em uma modalidade preferencial, o soforolipídeo é etil-17-L-[(2'-0-β-D-glucopiranosil-β-D-glucopiranosil)-oxi]-cis-9-octadecenoato-6"-acetato, etil-17-L-[(2'-0-β-D-glucopiranosil-β-D-glucopiranosil)-oxi]-cis-9-octadecenoato-6'-acetato, etil-17-L-[(2'-0-β-D-glucopiranosil-β-D-glucopiranosil)-oxi]-cis-9-octadecenoato-6'-6"-diacetato, butil-17-L-[(2'-0-β-D-glucopiranosil-β-D-glucopiranosil)-oxi]-cis-9-octadecenoato-6"-acetato, butil-17-L-[(2'-0-β-D-glucopiranosil-β-D-glucopiranosil)-oxi]-cis-9-octadecenoato-6'-acetato, e/ou butil-17-L-[(2'-0-β-D-glucopiranosil-β-D-glucopiranosil)-oxi]-cis-9-octadecenoato-6'-6"-diacetato.

[0036] Em algumas modalidades, o soforolipídeo pode ser um etil soforolipídeo 6"-mono-acetilado (ESL(6'OH,6"Ac) ou 6B-Ac-ESL), um etil soforolipídeo desacetilado (ESL(6'OH,6"OH) ou ESL), um etil soforolipídeo di-acetilada (ESL(6'Ac,6"Ac) ou Di-Ac-ESL), um butil soforolipídeo desacetilado (BSL(6'OH,6"OH) ou BuSL), um soforolipídeo di-acetilado (LSL(6'Ac,6"Ac) ou LSL) e/ou um butil

soforolipídeo di-acetilado (BSL(6'Ac,6"Ac) ou di-acetil BuSL).

[0037] Os soforolipídeos da invenção podem ser produzidos por qualquer microrganismo que produz naturalmente soforolipídeos. Os microrganismos, como levedura, produzem altos níveis de soforolipídeos. As leveduras que produzem soforolipídeos incluem, porém sem limitação, *Starmerella* (*Candida*) *bombicola*, *Candida floricola*, *Candida riocensis*, *Candida rugosa*, *Candida kuoi*, *Candida stellata*, *Candida tropicalis*, *Candida apicola*, *Torulopsis petrophilum*, *Rhodotorula* (*Candia*) *borgoriensis*, *Rhodotorula muciliginosa*, *Candida batistae*, *Torulopsis gropengiesseri*, *Cryptococcus* sp., *Cyberlindnera samutprakarnensis*, *Pichia anomala*, *Wickerhamiella domercqiae* e *Yarrowia lipolytica*.

[0038] Os soforolipídeos podem ser facilmente produzidos, por exemplo, pela inoculação de uma levedura que produz soforolipídeo em um meio líquido que contém fontes de carbono, como gordura vegetal ou óleo vegetal e açúcares, como glicose e pela agitação do meio enquanto aera o meio em uma temperatura amena e sob pressão. Em uma modalidade preferencial, os soforolipídeos são isolados e/ou purificados a partir da fermentação do meio para remover os subprodutos de fermentação antes do uso. Os métodos de isolamento e/ou purificação são conhecidos na técnica. Qualquer método de purificação e/ou isolamento adequado pode ser usado para obter soforolipídeos substancialmente purificados.

[0039] O termo "substancialmente livre" significa, de preferência, que as impurezas correspondentes estão

presentes apenas em quantidades residual, por exemplo, em menos que 5 % em peso, menos que 4 % em peso, menos que 3 % em peso, menos que 2 % em peso, menos que 1 % em peso, menos que 0,5 % em peso, menos que 0,2 % em peso, menos que 0,1 % em peso, menos que 0,01 % em peso, menos que 0,001 % em peso ou menos que 0,0001 % em peso, em relação ao peso completo do extrato seco correspondente ou composto da fórmula I ou mistura de compostos da fórmula I.

[0040] Em algumas modalidades, um microrganismo que produz naturalmente os soforolipídeos pode ser modificado para aumentar a produção dos soforolipídeos da invenção.

[0041] Em outras modalidades, os soforolipídeos da invenção também podem ser produzidos de modo recombinante ou podem ser sintetizados quimicamente.

[0042] A invenção fornece adicionalmente uma composição que compreende um soforolipídeo e pelo menos um composto adicional que inclui, porém sem limitação, água, um solvente (como etanol ou DMSO), um regulador de acidez (como ácido cítrico), um agente antiaglomerante (como isomalte), um agente anti formação (como metiletilcelulose, ou mono ou diglicerídeos de ácidos graxos), um antioxidante (como vitamine C ou sulfita), um aglutinante (como, por exemplo, ciclodextrina, ccarboximetilcelulose de sódio reticulada, etil, metil, hidroxipropil, hidroxipropilmetil ou metiletilcelulose), um agente avolumador (como celulose, metilcelulose ou cera de carnaúba), um carreador (como alginato), uma cor, um tensoativo, um agente de retenção de cor, um antimicrobiano (como pedamicina natamicina, nisina, ácido levulínico, ácido propiônico, ácido acético, ácidos de lúpulo e/ou arginato láurico), um emulsificador (como

polietileno glicol, triacetina, trietil citrato, óleo de castor, sais de colina, como lactato ou tartarato de colina, xilitol, lactitol, maltitol, polidimetilsiloxano, laurilsulfato de sódio e lecitina), um conservante (como natamicina), um dispersante (como compostos de polioxietileno, como monolaurato/mono-oleato/-monopalmitato/monostearato/tristearato de polioxietileno sorbitano, celulose, polivinilpirrolidona ou propileno glicol) e um espessante (como alginatos ou carragena).

[0043] De acordo com a invenção, a composição que compreende um soforolipídeo e pelo menos um composto adicional também é referida como "a composição de soforolipídeo" ou "aditivo para composição de ração". Os exemplos de um soforolipídeo ou aditivo para composição de ração são uma solução de soforolipídeo aquosa, uma suspensão de soforolipídeo aquosa e uma emulsão de soforolipídeo aquosa.

[0044] Em algumas modalidades, a composição de soforolipídeo é uma composição líquida. A vantagem de uma composição líquida consiste no fato de que pode ser convenientemente adicionada a um produto de ração, particularmente a um produto de ração líquido. A quantidade desejada pode ser medida, por exemplo, usando um cilindro ou frasco de medição, em vez de pesado. O uso de uma composição de soforolipídeo líquida permite que o soforolipídeo seja dissolvido mais rapidamente ou de modo mais eficaz e seja distribuído sobre o produto mais igualmente. Uma composição de soforolipídeo líquida pode ser menos propensa à formação de torta. Uma composição de soforolipídeo líquida preferencial pode compreender um

emulsificador ou um agente antiformação.

[0045] Alternativamente, o soforolipídeo ou aditivo para composição de ração é uma composição sólida. Uma vantagem de uma composição sólida consiste no fato de que tal composição é mais leve em termos de peso e pode ser mais estável que uma composição líquida. Uma composição de soforolipídeo sólida pode ser dispersa em ou sobre um produto de ração. Uma composição de soforolipídeo sólida preferencial compreende um carreador e/ou um dispersante, cujos componentes podem melhorar as propriedades de mistura ou podem facilitar a dosagem.

[0046] As dosagens das composições de aditivo para ração da presente invenção serão variadas dependendo das exigências do indivíduo e levarão em consideração os fatores, como espécies de animal, idade, peso e razões para perda de ganho de peso ou FCR.

[0047] Na prática, o aditivo para composição de ração de acordo com a invenção é adicionado à ração animal, diretamente ou como parte de uma mescla ou pré-mistura para composição de ração. Uma "pré-mistura" designa uma mistura preferencialmente uniforme de um ou mais microingredientes com diluente e/ou carreador. As pré-misturas são usadas para facilitar a dispersão uniforme de microingredientes em uma mistura maior.

[0048] O termo "ração animal" se refere a qualquer composto, preparação ou mistura adequada para ou destinada à ingestão por um animal. A ração animal para um animal monogástrico compreende tipicamente concentrados, bem como vitaminas, minerais, enzimas, microbiano alimentado diretamente, aminoácidos e/ou outros ingredientes de ração

(como em uma pré-mistura) enquanto a ração animal para ruminantes compreende geralmente forragem (incluindo fibras e silagem) e pode compreender adicionalmente concentrados, bem como vitaminas, minerais, enzimas microbianas alimentadas diretamente, aminoácidos e/ou outros ingredientes de ração (como em uma pré-mistura).

[0049] Concentrados: O termo "concentrados" significa ração com altas concentrações de proteína e energia, como farinha de peixe, melaço, oligossacarídeos, sorgo, sementes e grãos (integral ou preparado por esmagamento, moagem, etc. a partir, por exemplo, milho, aveia, centeio, cevada, trigo), torta por prensa de oleaginosas (por exemplo, a partir de semente de algodão, cártamo, girassol, soja (como refeição de soja), colza/canola, amendoim), torta de caroço de palma, material derivado de levedura e grãos de destilação (como grãos de destilação úmidos (WDS) e Grãos secos de destilaria com solúveis (DDGS)).

[0050] Em uma modalidade preferencial, a composição de mescla ou pré-mistura compreende o soforolipídeo ou aditivo para composição de ração descrito acima e pelo menos um ou mais ingredientes de ração.

[0051] Em uma modalidade, o um ou mais ingredientes de ração compreendem uma ou mais enzimas, de preferência, como descrito no presente documento abaixo.

[0052] Em uma modalidade, o um ou mais ingredientes de ração compreendem um ou mais probióticos, de preferência, como descrito no presente documento abaixo.

[0053] Em uma modalidade, o um ou mais ingredientes de ração compreendem uma ou mais vitaminas, de preferência, como descrito no presente documento abaixo.

[0054] Em uma modalidade, o um ou mais ingredientes de ração compreendem um ou mais minerais, de preferência, como descrito no presente documento abaixo.

[0055] Em uma modalidade, o um ou mais ingredientes de ração compreendem um ou mais aminoácidos, de preferência, como descrito no presente documento abaixo.

[0056] Em uma modalidade, o um ou mais ingredientes de ração compreendem um ou mais prébióticos, de preferência, como descrito no presente documento abaixo.

[0057] Em uma modalidade, o um ou mais ingredientes de ração compreendem um ou mais ácidos orgânicos, de preferência, como descrito no presente documento abaixo.

[0058] Em uma modalidade, o um ou mais ingredientes de ração compreendem um ou mais fitogênicos, de preferência, como descrito no presente documento abaixo.

[0059] Enzimas Adicionais

[0060] Em uma outra modalidade, as composições descritas no presente documento incluem opcionalmente uma ou mais enzimas. As enzimas podem ser classificadas com base no livro de mão Enzyme Nomenclature a partir de NC-IUBMB, 1992), consultar também o site ENZYME na internet: <http://www.expasy.ch/enzyme/>. ENZYME é um repositório de informações em relação à nomenclatura de enzimas. O mesmo tem como base primeiramente as recomendações do Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology [Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular] (IUB-MB), Academic Press, Inc., 1992, e descreve cada tipo de enzima caracterizada para qual se prevê um número EC (Enzyme Commission [Comissão de Enzima]) (Bairoch A. The

ENZYME database, 2000, *Nucleic Acids Res* 28:304-305). Essa nomenclatura de Enzima de IUB-MB tem como base sua especificidade de substrato e, ocasionalmente, seu mecanismo molecular; tal classificação não reflete os recursos estruturais dessas enzimas.

[0061] Uma outra classificação de certas enzimas de hidrolases de glicosídeos, como endoglucanase, galactanase, mananase, dextranase, lisozima e galactosidase é descrita em Henrissat *et al*, "The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013", *Nucl. Acids Res.* (1 janeiro de 2014) 42 (D1): D490-D495; consultar também www.cazy.org.

[0062] Assim, a composição de ração da invenção também pode compreender pelo menos uma outra enzima selecionada a partir do grupo que compreende galactanase (EC 3.2.1.89); alfa-galactosidase (EC 3.2.1.22); protease (EC 3.4); fosfolipase A1 (EC 3.1.1.32); fosfolipase A2 (EC 3.1.1.4); lisofosfolipase (EC 3.1.1.5); fosfolipase C (3.1.4.3); fosfolipase D (EC 3.1.4.4); amilase como, por exemplo, alfa-amilase (EC 3.2.1.1); arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55); beta-xilosidase (EC 3.2.1.37); acetil xilan esterase (EC 3.1.1.72); feruloil esterase (EC 3.1.1.73); celulase (EC 3.2.1.4); celobio-hidrolase (EC 3.2.1.91); beta-glucosidase (EC 3.2.1.21); pululanase (EC 3.2.1.41), alfa-manosidase (EC 3.2.1.24), mananase (EC 3.2.1.25) e beta-glucanase (EC 3.2.1.4 ou EC 3.2.1.6) ou qualquer combinação dos mesmos.

[0063] Em uma modalidade particular, a composição de ração da invenção compreende uma fitase (EC 3.1.3.8 ou 3.1.3.26). Os exemplos de fitases comercialmente disponíveis incluem Bio-Feed™ Phytase (Novozymes),

Ronozyme® P, Ronozyme® NP e Ronozyme® HiPhos (DSM Nutritional Products), Natuphos™ (BASF), Finase® e Quantum® Blue (AB enzimas), OptiPhos® (Huvepharma) Phyzyme® XP (Verenium/DuPont) e Axtra® PHY (DuPont). Outras fitases preferenciais incluem aquelas descritas, por exemplo, nos documentos WO 98/28408, WO 00/43503 e WO 03/066847.

[0064] Em uma modalidade particular, a composição de ração da invenção compreende uma protease (EC 3.4). Exemplos de proteases comercialmente disponíveis incluem Ronozyme® ProAct (DSM Nutritional Products).

[0065] Micróbios

[0066] Em uma modalidade, a composição de ração animal compreende adicionalmente um ou mais micróbios adicionais. Em uma modalidade particular, a composição de ração animal compreende adicionalmente uma bactéria a partir de um ou mais dos seguintes gêneros: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* e *Megasphaera* ou qualquer combinação dos mesmos.

[0067] Em uma modalidade preferencial, a composição de ração animal compreende adicionalmente uma bactéria a partir de uma ou mais das seguintes cepas: *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus spp*, e *Pediococcus spp*, *Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium spp*, *Lactobacillus acidophilus*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*,

Propionibacterium thoenii, *Lactobacillus farciminus*,
Lactobacillus rhamnosus, *Clostridium butyricum*,
Bifidobacterium animalis ssp. animalis, *Lactobacillus reuteri*,
Lactobacillus salivarius ssp. salivarius,
Megasphaera elsdenii, *Propionibacteria sp.*

[0068] Em uma modalidade mais preferencial, uma pré-mistura para ração ou ração animal compreende adicionalmente uma bactéria a partir de uma ou mais das seguintes cepas de *Bacillus subtilis*: 3A-P4 (PTA-6506), 15A-P4 (PTA-6507), 22C-P1 (PTA-6508), 2084 (NRRL B-500130), LSSA01 (NRRL-B-50104), BS27 (NRRL B-501 05), BS 18 (NRRL B-50633), BS 278 (NRRL B-50634), DSM 29870, DSM 29871, NRRL B-50136, NRRL B-50605, NRRL B-50606, NRRL B-50622 e PTA-7547.

[0069] Em uma modalidade mais preferencial, uma pré-mistura para ração ou ração animal compreende adicionalmente uma bactéria a partir de uma ou mais das seguintes cepas de *Bacillus pumilus*: NRRL B-50016, ATCC 700385, NRRL B-50885 ou NRRL B-50886.

[0070] Em uma modalidade mais preferencial, uma pré-mistura para ração ou ração animal compreende adicionalmente uma bactéria a partir de uma ou mais das seguintes cepas de *Bacillus lichenformis*: NRRL B 50015, NRRL B-50621 ou NRRL B-50623.

[0071] Em uma modalidade mais preferencial, uma pré-mistura para ração ou ração animal compreende uma bactéria a partir de uma ou mais das seguintes cepas de *Bacillus amyloliquefaciens*: DSM 29869, DSM 29872, NRRL B 50607, PTA-7543, PTA-7549, NRRL B-50349, NRRL B-50606, NRRL B-50013, NRRL B-50151, NRRL B-50141, NRRL B-50147 ou NRRL B-50888.

[0072] A contagem bacteriana de cada uma das cepas bacterianas na composição de ração animal é entre 1×10^4 e 1×10^{14} CFU/kg de matéria seca, de preferência, entre 1×10^6 e 1×10^{12} CFU/kg de matéria seca e, com mais preferência, entre 1×10^7 e 1×10^{11} CFU/kg de matéria seca. Em uma modalidade mais preferencial, a contagem bacteriana de cada uma das cepas bacterianas na composição de ração animal está entre 1×10^8 e 1×10^{10} CFU/kg de matéria seca.

[0073] A contagem bacteriana de cada uma das cepas bacterianas na composição de ração animal está entre 1×10^5 e 1×10^{15} CFU/animal/dia, de preferência, entre 1×10^7 e 1×10^{13} CFU/animal/dia e, com mais preferência, entre 1×10^8 e 1×10^{12} CFU/animal/dia. Em uma modalidade mais preferencial, a contagem bacteriana de cada uma das cepas bacterianas na composição de ração animal está entre 1×10^9 e 1×10^{11} CFU/animal/dia.

[0074] Em uma outra modalidade, a uma ou mais cepas bacterianas estão presentes na forma de um esporo estável.

[0075] Aminoácidos

[0076] A composição de ração da invenção pode compreender adicionalmente um ou mais aminoácidos. Os exemplos de aminoácidos que são usados na ração animal são lisina, alanina, beta-alanina, treonina, metionina e triptofano.

[0077] Vitaminas e Minerais

[0078] Em uma outra modalidade, a ração animal pode incluir uma ou mais vitaminas, como uma ou mais vitaminas solúveis em gordura e/ou uma ou mais vitaminas solúveis em água. Em uma outra modalidade, a ração animal pode opcionalmente incluir um ou mais minerais, como um ou mais

minerais residuais e/ou um ou mais macrominerais.

[0079] Geralmente, vitaminas solúveis em água e em gordura, bem como minerais residuais formam parte de uma denominada pré-mistura pretendida para a adição à ração, ao passo que macrominerais geralmente são adicionados separadamente à ração.

[0080] Os exemplos não limitativos de vitaminas solúveis em gordura- incluem vitamina A, vitamina D3, vitamina E e vitamina K, por exemplo, vitamina K3.

[0081] Os exemplos não limitativos de vitaminas solúveis em água -incluem vitamina B12, biotina e colina, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, niacina, ácido fólico e pantotenato, por exemplo, Ca-D-pantotenato.

[0082] Os exemplos não limitativos de minerais residuais incluem boro, cobalto, cloreto, cromo, cobre, fluoreto, iodo, ferro, manganês, molibdênio, selênio e zinco.

[0083] Os exemplos não limitativos de macrominerais incluem cálcio, magnésio, potássio e sódio.

[0084] As exigências nutricionais desses componentes (exemplificados com aves e leitões/porcos) são listadas na Tabela A do documento WO 2001/058275. A exigência nutricional significa que esses componentes devem ser fornecidos na dieta nas concentrações indicadas.

[0085] Como alternativa, o aditivo animal para ração da invenção compreende pelo menos um dos componentes individuais especificados na Tabela A do documento WO 01/58275. Pelo menos um significa qualquer um dentre, um ou mais dentre, um ou dois ou três ou quatro e assim por diante até todos os treze ou até todos os quinze componentes individuais. Mais especificamente, esse pelo

menos um componente individual está incluído no aditivo da invenção em tal quantidade de modo a fornecer uma concentração em ração dentro da faixa indicada na coluna quatro ou coluna cinco ou coluna seis de Tabela A.

[0086] Em uma modalidade ainda adicional, o aditivo animal para ração da invenção compreende pelo menos uma das vitaminas abaixo, de preferência, para fornecer uma concentração em ração dentro das faixas especificadas na Tabela 1 abaixo (para dietas de frangos de corte, respectivamente).

Tabela 1: Recomendações típicas de vitamina

| Vitamina | Dieta para frangos de corte |
|-----------------------|------------------------------------|
| Vitamina A | 8-12.500 IU/kg de ração |
| Vitamina D3 | 3000-5000 IU/kg de ração |
| Vitamina E | 150-240 mg/kg de ração |
| Vitamina K3 | 2-4 mg/kg de ração |
| Vitamina B1 | 2-3 mg/kg de ração |
| Vitamina B2 | 7-9 mg/kg de ração |
| Vitamina B6 | 3-6 mg/kg de ração |
| Vitamina B12 | 0,015-0,04 mg/kg de ração |
| Niacina (Vitamina B3) | 50-80 mg/kg de ração |
| Ácido Pantotênico | 10-18 mg/kg de ração |
| Ácido Fólico | 1-2 mg/kg de ração |
| Biotina | 0,15-0,3 mg/kg de ração |
| Cloreto de Colina | 300-600 mg/kg de ração |

[0087] Outros ingredientes de ração

[0088] A composição de ração da invenção pode compreender adicionalmente agentes corantes, estabilizantes, aditivos para melhorar o crescimento e

compostos de aroma/aromatizantes, ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs); espécies de geração de oxigênio reativo, peptídeos anti-microbianos e polipeptídeos antifúngicos.

[0089] Os exemplos de agentes corantes são carotenoides, como beta-caroteno, astaxantina e luteína.

[0090] Os exemplos de compostos de aroma/aromatizantes são creosol, anetol, deca, undeca e/ou dodecalactonas, iononas, irona, gingerol, piperidina, propilidena fatalida, butilideno fatalida, capsaicina e tanina.

[0091] Os exemplos de agentes de estabilização (por exemplo, acidificantes) são ácidos orgânicos. Os exemplos desses são ácido benzoico (VevoVital®), DSM Nutritional Products), ácido fórmico, ácido butírico, ácido fumárico e ácido propiônico.

[0092] Os exemplos de peptídeos antimicrobianos (AMP's) são CAP18, Leucocina A, Tritrpticina, Protegrina-1, Tanatina, Defensina, Lactoferrina, Lactoferricina e Ovispirina, como Novispirina (Robert Lehrer, 2000), Plectasinas e Estatinas, que incluem os compostos e polipeptídeos revelados nos documentos WO 03/044049 e WO 03/048148, bem como variantes ou fragmentos dos mencionados acima que retêm atividade antimicrobiana.

[0093] Os exemplos de polipeptídeos antifúngicos (AFP's) são os peptídeos *Aspergillus giganteus* e *Aspergillus niger*, bem como variantes e fragmentos dos mesmos que retêm atividade antifúngica, como revelado nos documentos WO 94/01459 e WO 02/090384.

[0094] Exemplos de ácidos graxos poli-insaturados são ácidos graxos poli-insaturados C18, C20 e C22, tais como

ácido araquidônico, ácido docoso-hexaenoico, ácido eicosapentaenoico e ácido gama-linoleico.

[0095] Os exemplos de espécies de geração de oxigênio reativo são produtos químicos, como perborato, persulfato ou percarbonato; e enzimas, como uma oxidase, uma oxigenase ou uma sintetase.

[0096] A composição da invenção pode compreender adicionalmente pelo menos um aminoácido. Os exemplos de aminoácidos que são usados na ração animal são lisina, alanina, beta-alanina, treonina, metionina e triptofano.

[0097] Um exemplo particular de uma mescla ou composições de pré-mistura da invenção compreendem (a) pelo menos um soforolípídeo especificado acima no presente documento (b) pelo menos uma vitamina solúvel em gordura, (c) pelo menos uma vitamina solúvel em água (d) pelo menos um mineral residual e/ou (e) pelo menos um macromineral.

[0098] A presente invenção também se refere a composições de ração animal que compreendem um ou mais soforolípídeos da invenção. Em uma modalidade, a invenção se refere a uma ração animal que compreende o grânulo como descrito no presente documento e material à base de planta. Em uma modalidade, a invenção se refere a uma ração animal que compreende o aditivo animal para ração como descrito no presente documento e material à base de planta.

[0099] Dietas ou composições de ração animal têm um teor relativamente alto de proteína. As dietas para aves e porcos podem ser caracterizadas como indicado na Tabela B do documento WO 01/58275, colunas 2-3. As dietas para peixes podem ser caracterizadas como indicado na coluna 4 dessa Tabela B. Além disso, tais dietas para peixe têm

usualmente um teor bruto de gordura de 200-310 g/kg.

[0100] Uma composição de ração animal preferencial de acordo com a invenção tem um teor bruto de proteína de 50-800 g/kg e, além disso, compreende pelo menos um soforolípídeo como reivindicado no presente documento.

[0101] Adicional ou alternativamente (ao teor bruto de proteína indicado acima), a composição de ração animal da invenção tem um teor de energia metabolizável de 10-30 MJ/kg; e/ou um teor de cálcio de 0,1-200 g/kg; e/ou um teor de fósforo disponível de 0,1-200 g/kg; e/ou um teor de metionina de 0,1-100 g/kg; e/ou um teor de metionina mais cisteína de 0,1-150 g/kg; e/ou um teor de lisina de 0,5-50 g/kg.

[0102] Em modalidades particulares, o teor de energia metabolizável, proteína bruta, cálcio, fosforo, metionina, metionina mais cisteína e/ou lisina está dentro de qualquer uma das faixas 2, 3, 4 ou 5 na Tabela B do documento WO 01/58275 (R. 2-5).

[0103] A proteína bruta é calculada como nitrogênio (N) multiplicado por um fator 6,25, isto é, Proteína bruta (g/kg) = N (g/kg) x 6,25. O teor de nitrogênio é determinado pelo método Kjeldahl (A.O.A.C., 1984, Official Methods of Analysis 14^a Ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington DC).

[0104] A energia metabolizável pode ser calculada com base nas exigências de Nutriente da publicação de NRC em suínos, nona edição revisada 1988, subcomissão em nutrição de suínos, comitê sobre nutrição de animal, conselho de agricultura, Concelho Nacional de Pesquisa. National Academy Press, Washington, D.C., páginas 2-6, e a Tabela

Europeia de Valores Energéticos para Alimentos para Aves, Centro Spelderholt para pesquisa e extensão de aves, 7361 DA Beekbergen, Países Baixos. Grafisch bedrijf Ponsen & looijen bv, Wageningen. ISBN 90-71463-12-5.

[0105] O teor de cálcio dietético, fósforo disponível e aminoácidos em dietas completas para animal é calculado com base nas tabelas de ração, como Veevoedertabel 1997, gegevens over chemische samenstelling, verteerbaarheid en voederwaarde van voedermiddelen, Central Veevoederbureau, Runderweg 6, 8219 pk Lelystad. ISBN 90-72839-13-7.

[0106] Em uma modalidade particular, a composição de ração animal da invenção contém pelo menos uma proteína vegetal como definido acima.

[0107] A composição de ração animal da invenção também pode conter proteína animal, como Farinha de Carne e Ossos, Farinha de penas e/ou farinha de peixe, tipicamente em uma quantidade de 0-25 %. A composição de ração animal da invenção também pode compreender Grãos secos de destilaria com solúveis (DDGS), tipicamente em quantidades de 0-30 %.

[0108] Ainda em modalidades adicionalmente particulares, a composição de ração animal da invenção contém 0-80 % de milho; e/ou 0-80 % de sorgo; e/ou 0-70 % de trigo; e/ou 0-70 % de cevada; e/ou 0-30 % de aveia; e/ou 0-40 % de farinha de soja; e/ou 0-25 % de farinha de peixe; e/ou 0-25 % de farinha de carne e ossos; e/ou 0-20 % de soro.

[0109] A ração animal pode compreender proteínas vegetais. Em modalidades particulares, o teor de proteína das proteínas vegetais é pelo menos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ou 90 % (p/p). As proteínas vegetais podem ser derivadas de fontes vegetais de proteína, como legumes e

cereais, por exemplo, materiais a partir de plantas das famílias Fabaceae (Leguminosae), Cruciferae, Chenopodiaceae e Poaceae, como farinha de soja, farinha de tremoço, farinha de colza e combinações dos mesmos.

[0110] Em uma modalidade particular, a fonte de proteína vegetal consiste em material a partir de uma ou mais plantas da família Fabaceae, por exemplo, soja, tremoço, ervilha ou feijão. Em uma outra modalidade particular, a fonte de proteína vegetal consiste em material a uma ou mais plantas da família Chenopodiaceae, por exemplo, beterraba, beterraba sacariana, espinafre ou quinoa. Outros exemplos de fontes vegetais de proteína são colza e repolho. Em uma outra modalidade particular, a soja é uma fonte de proteína vegetal preferencial. Outros exemplos de fontes vegetais de proteína são cereais, como cevada, trigo, centeio, aveia, milho (milho), arroz e sorgo.

[0111] A ração animal (ou dietas para animal) pode, por exemplo, ser fabricada como ração em pasta (não peletizada) ou ração peletizada. Tipicamente, os alimentos moídos são misturados e quantidades suficientes de vitaminas e minerais essenciais são adicionadas de acordo com as especificações para as espécies em questão. Os soforolipídeos podem ser adicionados como formulações sólidas ou líquidas. Por exemplo, para ração em pasta, uma formulação de soforolipídeo sólida ou líquida pode ser adicionada antes ou durante a etapa de mistura de ingrediente. Para a ração peletizada (líquida ou sólida), a preparação de soforolipídeo também pode ser adicionada antes ou durante a etapa de ingrediente de ração.

[0112] **EXEMPLOS**

[0113] Os sofrorolipídeos podem ser analisados, por exemplo, por espectrometria de HPLC, LC-MS ou RMN. Um método de espectrometria de RMN adequado é como a seguir: aproximadamente, 5 mg do sofrorolipídeo e padrão interno (dimetoxi benzeno) podem ser pesados (dentro de 0,001 mg, com microbalança) em um frasco de 4 ml. As amostras podem ser dissolvidas em 2 ml de MeOD. Os espectros de ¹H RMN podem ser registrados em um RMN de 700 MHz equipado com uma sonda, medido com uma temperatura de sonda de 300K com um atraso de interpulso de 30 segundos e 16 varreduras. Uma metodologia de LC-MS adequada é como a seguir: Coluna: Uma coluna UPLC de fase reversa (C18) (1,7 µm, 100 x 2,1 mm (LxID) e eluição de gradiente. A coluna é mantida a 50 °C. A eluição de gradiente é realizada pela mistura de 0,1 % de ácido fórmico em água (A) e 0,1 % de ácido fórmico em acetonitrila da seguinte forma: 0-14 min, 40 % de B a 100 % de B; 14-17 min, 100 % de B; 17-17,1 min, 100 % de B a 40 % de B e 17,1-20 min, 40 % de B. A taxa de fluxo é 400 µl/min. O modo de APCI de íon positivo é escolhido como modo de ionização para esses compostos, a identificação é realizada por espectrometria de massa de alta resolução. A quantificação é realizada por curvas de calibração externa em combinação com correção de padrão interno.

[0114] EXEMPLO 1: Avaliação de toxicidade de sofrorolipídeos em leucócitos de sangue periférico humano (PBLs).

[0115] A viabilidade celular foi medida por Alamar Blue em várias concentrações (1,25 µm, 2,5 µm, 5 µm, 10 µm, e 20 µm) de seis sofrorolipídeos: LSL(6'Ac,6"Ac); ESL(6'OH,6"Ac); ESL(6'OH,6"OH); ESL(6'Ac,6"Ac);

BSL(6'OH,6"OH); e BSL(6'Ac,6"Ac).

[0116] Resultados: Nenhum dos soforolipídeos induziram a toxicidade em qualquer concentração testada.

[0117] **EXEMPLO 2: Avaliação de efeito de soforolipídeos em mediadores inflamatórios em PBLs humanos.**

[0118] PBLs foram isolados do sangue humano. PBLs foram tratados com LPS para induzir a resposta inflamatória na presença de diferentes concentrações (1 μ m, 5 μ m, e 10 μ m) de seis soforolipídeos: LSL(6'Ac,6"Ac); ESL(6'OH,6"Ac); ESL(6'OH,6"OH); ESL(6'Ac,6"Ac); BSL(6'OH,6"OH); e BSL(6'Ac,6"Ac).

[0119] Resultados: ESL(6'OH,6"OH) diminuiu a secreção de IL-1 β , secreção de IL-6, secreção de IL-8, secreção de TNF- α e secreção de MIP-1 β . ESL(6'Ac,6"Ac) diminuiu a secreção de IL-1 β , secreção de IL-6, secreção de IL-8, secreção de TNF- α e secreção de MIP-1 β . BSL (6'OH,6"OH) diminuiu a secreção de IL-1 β , secreção de IL-6, secreção de IL-8, secreção de TNF- α e secreção de MIP-1 β . LSL(6'Ac,6"Ac) diminuiu a secreção de IL-8, secreção de TNF- α e secreção de MIP-1 β . ESL(6'OH,6"Ac) diminuiu a secreção de TNF- α e a secreção de MIP-1 β . BSL(6'Ac,6"Ac) diminuiu a secreção de TNF- α . Todos os seis soforolipídeos aumentaram a secreção de RANTES.

[0120] Esses resultados demonstraram que os soforolipídeos têm efeitos anti-inflamatórios e anticitocina em PBLs.

[0121] **EXEMPLO 3: Avaliação de efeito de soforolipídeos em mediadores inflamatórios em microglia.**

[0122] As células microgliais foram obtidas a partir de culturas microgliais primárias a partir de ratos E22. No

dia 1, as células microgliciais foram cultivadas em placas de 96 poços e permitiu-se sua adesão por 24 horas. No dia 3, as células microgliciais foram pré-tratadas com sofrorolipídeo por 24 horas (n = 11). No dia 4, as células microgliciais foram estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS). No dia 5, os tensoativos foram coletados e analisados para citocinas de interesse.

[0123] O pré-tratamento de sofrorolipídeo foi eficaz na redução tanto de secreção de PGE2 (IC50 = 29,8 µM) quanto de secreção de TNF-alfa (IC50 = 21,2 µM).

[0124] **EXEMPLO 4: Avaliação de toxicidade de sofrorolipídeos em células epiteliais do cólon.**

[0125] As células HT-29 (uma linhagem celular de adenocarcinoma de cólon) foram usadas devido ao fato de que essas células se assemelham a células intestinais maduras *in vitro*. A viabilidade celular foi medida por Alamar Blue em várias concentrações (1,25 µm, 2,5 µm, 5 µm, 10 µm, e 20 µm) de seis sofrorolipídeos: LSL(6'Ac,6"Ac); ESL(6'OH,6"Ac); ESL(6'OH,6"OH); ESL(6'Ac,6"Ac); BSL(6'OH,6"OH); e BSL(6'Ac,6"Ac).

[0126] Resultados: Nenhum dos sofrorolipídeos induziram a toxicidade em qualquer concentração testada.

[0127] **EXEMPLO 5: Composição de Pré-mistura para Ração Animal**

[0128] Uma composição de pré-mistura para ração de animal é preparada pela adição de 20 g de pelo menos uma composição de sofrorolipídeo à seguinte pré-mistura (por quilo de pré-mistura):

| | |
|------------|-------------|
| 1100000 IE | Vitamina A |
| 300000 IE | Vitamina D3 |

| | |
|----------|----------------------------|
| 4000 IE | Vitamina E |
| 250 mg | Vitamina B1 |
| 800 mg | Vitamina B2 |
| 1200 mg | Ca-D-Pantotenato |
| 500 mg | Vitamina B6 |
| 2,5 mg | Vitamina B12 |
| 5000 mg | Niacina |
| 10000 mg | Vitamina C |
| 300 mg | Vitamina K3 |
| 15 mg | Biotina |
| 150 mg | Ácido Fólico |
| 50004 mg | Cloreto de Colina |
| 6000 mg | Fe |
| 3000 mg | Cu |
| 5400 mg | Zn |
| 8000 mg | Mn |
| 124 mg | I |
| 60 mg | Co |
| 29,7 mg | Se |
| 9000 mg | Lasalocida Sódica (Avatec) |
| 17,3 % | Ca |
| 0,8 % | Mg |
| 11,7 % | Na |

[0129] EXEMPLO 6: Ração Animal

[0130] Uma dieta para produtor de frangos de corte que tem a seguinte composição (% , p/p) é preparada pela mistura dos ingredientes. Trigo, centeio e SBM 48 são disponíveis a partir de Moulin Moderne Hirsingue, Hirsingue, França. Após

a mistura, a ração é peletizada em uma temperatura desejada, por exemplo, cerca de 70 °C (3 x 25 mm).

| | |
|-----------------------------------|-------|
| Trigo | 46,00 |
| Centeio | 15,00 |
| Farinha de Soja (SBM 48) | 30,73 |
| Óleo de soja | 4,90 |
| DL-Metionina | 0,04 |
| DCP (Fosfato de Di-Cálcio) | 1,65 |
| Calcário | 0,43 |
| Sal | 0,15 |
| TiO ₂ | 0,10 |
| Aditivo animal para ração (acima) | 1,00 |

[0131] A ração animal resultante compreende 200 mg de pelo menos uma composição de soforolipídeo por kg (200 ppm).

[0132] **EXEMPLO 7: Efeito de suplementação alimentar de soforolipídeos no desempenho e capacidade de digestão em frangos de corte não desafiados.**

[0133] Sumário: O tratamento de SL alimentar mostrou um efeito benéfico e imunomodulador limpo no crescimento de frangos de corte comerciais em faixas de dose que foram usadas nesse ensaio com base em várias análises imunológicas. SL4 mostrou claramente efeitos antiparasíticos *in vivo* e seus dados *in vitro* preliminares suportados nessa conclusão. Além disso, há efeitos imunomoduladores claros de tratamento de SL em resposta imune intestinal e integridade intestinal.

[0134] Projeto Experimental

[0135] Quatro amostras de soforolipídeos (SL) diferentes

a partir de DSM foram avaliadas usando coccidiose de ARS e enterite necrótica (NE) diminuíram os modelos usando frangos de corte comerciais. Para cada ensaio, o controle negativo (não infectado e não tratado) e controles de infecção não tratada para coccidiose e NE foram incluídos.

[0136] Um total de 672 aves foi usado. Os frangos de corte de um dia de idade foram dotados da dieta padrão formulada com ARS (Tabela 2) e dietas suplementadas com 200 ppm de doses soforolipídeos como indicado na Tabela 1 a partir do dia 0 até o final do ensaio.

[0137] Tabela 1. Grupos de Tratamento em Esboço Experimental

| | | Desafio | Aves totais | Nível de Inclusão de SL |
|--------------------|--------------|---------|-------------|-------------------------|
| Coccidiose | Controle | Não | 56 | - |
| | Inf-Controle | Sim | 56 | - |
| | SL 1 | | 56 | 200 ppm |
| | SL 2 | | 56 | 200 ppm |
| | SL 3 | | 56 | 200 ppm |
| | SL 4 | | 56 | 200 ppm |
| Enterite Necrótica | Controle | Não | 56 | - |
| | Inf-Controle | Sim | 56 | - |
| | SL 1 | | 56 | 200 ppm |
| | SL 2 | | 56 | 200 ppm |
| | SL 3 | | 56 | 200 ppm |
| | SL 4 | | 56 | 200 ppm |

[0138] Coccidiose: Início com 24 % de dieta CP

[0139] Enterite Necrótica: Início com 18 % de dieta de CP, alterar para 24 % após infecção por *Clostridium Perfringens*

[0140] Materiais e Métodos:

[0141] Frangos:

[0142] Um total de 672 frangos de corte Ross 708 do sexo masculino de um dia (recém-nascidos) foram adquiridos no incubatório de Longenecker, Elizabethtown, PA, EUA. Assim que chegaram às instalações da ARS em Beltsville, foram divididos em 12 grupos em um projeto completamente aleatório e colocados em gaiolas iniciais Petersime de acordo com as diretrizes da Beltsville Animal Care e receberam ração e água *ad libitum*. As aves foram mantidas em currais até os 14 dias de idade, inspecionadas diariamente para o bem-estar animal e transferidas para as gaiolas de acabamento da Petersime, onde foram mantidas até o final do período experimental. Todos os procedimentos experimentais de transporte e infecção foram aprovados pelo Comitê de Cuidados com Animais Pequenos da BARC.

[0143] Ração:

[0144] Todos os frangos receberam uma dieta pobre em proteínas e livre de antibióticos (18 % de proteína bruta, base de matéria seca) do dia 1 ao 7 e uma dieta rica em proteínas (24 % de proteína bruta, base de matéria seca) (feita nas instalações da ARS) do dia 7 até o final do experimento. Ração e água foram determinadas *ad libitum*. A alimentação da dieta de tratamento suplementada começou a partir do dia 0 de idade e durante todo o período experimental. A ração foi suplementada com produto antimicrobiano como mostrado na Tabela 1 de acordo com um regime de tratamento.

[0145] O método usado para misturar SL com ração de frango padrão:

[0146] A 60 g de cada uma das amostras de soforolipídeo que foram dissolvidas em 100 g de Sulfóxido de dimetila, o óleo de soja foi adicionado para obter 2000 g de volume líquido total por amostra. Para isso, 1 g de SL foi lentamente adicionado a 5 kg de ação para alcançar 200 ppm (0,02 %) de concentração final. Por semana, 200 g de óleo de soja foram usados para dissolver 6 g de SL para gerar 30 kg de mistura de ração.

[0147] Modelo do desafio da doença da coccidiose de Beltsville:

[0148] Nos 15 dias de idade, as aves foram infectadas por via oral com 1×10^4 oocistos de *E. maxima* (cepa Beltsville 41)/ave. Oocistos de *E. maxima* são mantidos por mês pela infecção de frangos de corte de 2 semanas de idade por via oral com 10.000 oocistos *E. maxima* esporulado e os testes de DNA são realizados a título de sua pureza. Para induzir a lesão intestinal e para obter derramamento ideal de oocisto, usou-se normalmente 10.000 oocistos esporulados para infecção e derramamento fecal de oocisto é examinado pela coleta de oocistos diários de 5 dpi a 7 dpi.

[0149] Modelo da Doença de Enterite Necrótica de Beltsville:

[0150] O modelo de NE experimental foi desenvolvido em ARS e descrito por Park et al., (2008). Nos 15 dias de idade, as aves foram infectadas por via oral com 1×10^4 de oocistos de *E. maxima* (cepa de Beltsville 41)/ave, seguido de infecção por *C. perfringens* (1×10^9 CFU/ave, cepa netB+dell) por via oral 4 dias depois (d 19 de idade) para induzir uma infecção de NE clínica. As aves foram comutadas para uma dieta de alto teor de proteína a partir de d 19 de

idade para facilitar o desenvolvimento de NE.

[0151] Contagem e coleta de oocisto fecal:

[0152] Amostras de fezes de cada grupo foram coletadas durante 5 a 7 dias após a infecção por *E. maxima* para avaliar os efeitos dos sopololipídeos na sobrevivência do parasita. As taxas de redução de oocisto por cada grupo de tratamento foram calculadas usando a câmara de contagem de McMaster.

[0153] Classificação de lesão intestinal:

[0154] Coccidiose: Classificação de lesão foi realizada 5 dias após infecção por *E. maxima*. 8 aves por grupo foram sacrificadas e aproximadamente 20 cm de segmentos intestinais jejunais com extensão de 10 cm anterior e posterior ao divertículo foram obtidos. As seções intestinais foram classificadas para lesões de NE em uma escala de 0 (nenhum) a 4 (alto) de maneira cega por seis observadores independentes.

[0155] NE: A classificação de lesão foi realizada 2 dias após a infecção por *C. perfringens* (6 dias após a infecção por *E. maxima*). 8 aves por grupo foram sacrificadas e aproximadamente 20 cm de segmentos intestinais com extensão de 10 cm anterior e posterior ao divertículo foram obtidos. As seções intestinais foram classificadas para lesões de NE em uma escala de 0 (nenhum) a 4 (alto) de maneira cega por seis observadores independentes.

[0156] Amostras de sangue e Glicoproteína de α -1-Ácido de Frango:

[0157] Foram coletadas amostras de sangue por punção cardíaca que seguem imediatamente a eutanásia em cada data de amostragem (8 aves/trt). O soro foi separado por

centrifugação a 1000 rpm por 20 min a 4 ° C e as frações séricas armazenadas a -20 ° C até uso posterior. A glicoproteína de α -1-ácido de frango (α -1-AGP) no soro foi medida por

[0158] ELISA (Life Diagnostics Inc., West Chester, PA, EUA) de acordo com a instrução do fabricante. Os valores de OD450 foram determinados com um leitor de microplaca automático (Bio-Rad, Richmond, CA, EUA).

[0159] Coleta de amostras intestinais:

[0160] Oito aves por grupo de tratamento foram aleatoriamente selecionadas em cada data de amostragem e usados para a coleta de amostras de intestino (íleo) para extração de RNA para medir citocina/quimiocina e expressão de proteína de junção. As aves foram sacrificadas por deslocamento cervical e os intestinos foram removidos imediatamente. Uma pequena seção de íleo a partir de cada ave foi coletada assepticamente e armazenada em RNAlater® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) a -20 °C para uso adicional.

[0161] A análise de expressão de gene por PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR):

[0162] As sequências de iniciador de oligonucleotídeo foram usadas para qRT-PCR são mostradas na Tabela 3. As várias citocinas e proteínas de junção intestinal estreita cuja expressão diferencial foi avaliada no íleo incluem interleucina (IL)1 β , IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, IL13, IL17F, interferon (IFN) γ , superfamília do fator de necrose tumoral (TNFSF)15, molécula de adesão juncional (JAM)2, ocludina, zona ocludente (ZO)1 e mucina 2 (MUC2). As sequências de iniciador de proteínas TJ e MUC2 foram adaptadas a partir

de Chen *et al.*, 2015 e mostradas na Tabela 3A. Breve descrição da função de citocinas/quimiocina de frango e proteínas de junção estreita são mostradas na Tabela 3B. Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi usado como o gene de referência. Amplificação e detecção foram executadas usando o sistema Stratagene Mx3000P qPCR (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, EUA) e misturador principal RT² SYBR Green qPCR (Qiagen). Cada amostra foi analisada em triplicados e a amplificação não específica de iniciadores foi verificada por inclusão de nenhum controle de modelo. As curvas padrão foram geradas usando RNA diluído por log₁₀ e as transcrições de níveis de indivíduo serão normalizadas para aqueles de GAPDH usando o programa Q-gene (Muller *et al.*, 2002).

[0163] Ensaio anticoccidial:

[0164] Os esporozoítos de aves *Eimeria acervulina* foram purificados de modo fresco a partir de oocistos esporulados para avaliar efeitos citotóxicos de SL em esporozoítos vivos usando o método desenvolvido no laboratório do Dr. Lillehoj. Brevemente, oocistos esporulados de modo fresco foram interrompidos com esferas de vidro de 0,5 mm usando um batedor de miniesferas (Biospec Products, EUA). Os esporocistos liberados foram purificados por centrifugação isopélica em um gradiente de Percoll, lavados em solução salina balanceada de Hank (HBSS) gelada e tratados com tripsina a 0,25 % e ácido taurocólico a 0,014 M (Sigma, EUA) a 41 °C para liberar esporozoítos vivos. Os esporozoítos recém-preparados foram coletados por filtração, lavados 3 vezes com HBSS a 3.000 × g por 10 min a 4 °C e ressuspensos em 1,0 × 10⁶/ml em HBSS. Os

esporozoítos coletados foram incubados a 41 °C com várias concentrações de amostras de SL ou peptídeo NK como um controle positivo (peptídeo NK lisina é produzido no laboratório do Dr. Lillehoj e extermina os esporozoítos) por 3 h a 41C em incubadora de CO₂. Para acessar a viabilidade dos esporozoítos, foi realizado o ensaio de proliferação celular direta CyQuant (Thermo Fisher Scientific, EUA), usando esporozoítos vivos corados com FITC e a fluorescência foi medida a 485/528 nm, usando Synergy HTX (Biotek, EUA).

[0165] Tabela 2. Composição de ingrediente de Dieta basal de USDA-ARS

| Ingredientes (%) | Baixo teor de proteína | Alto teor de proteína |
|------------------------------------|------------------------|-----------------------|
| Milho | 69,01 | 55,78 |
| Farinha de soja | 23,99 | 37,03 |
| Óleo de soja | 2,75 | 2,97 |
| Fosfato dicálcico | 2,00 | 1,80 |
| Carbonato de cálcio | 1,40 | 1,51 |
| Sal | 0,35 | 0,38 |
| Mistura de Vitamina para Aves | 0,20 | 0,22 |
| Mistura de Mineral para Aves | 0,15 | 0,15 |
| DL-Metionina | 0,10 | 0,10 |
| Cloreto de colina, 60 % | 0,05 | 0,06 |
| Total | 100 | 100 |
| Valores calculados (base de DM, %) | | |
| CP, % | 18,00 | 24,00 |
| Ca, % | 1,19 | 1,20 |
| Disponível P, % | 0,54 | 0,51 |
| Lys, % | 1,00 | 1,40 |
| Met, % | 0,42 | 0,49 |
| Cys + Met, % | 0,65 | 0,80 |
| TME _n , kcal/kg | 3585 | 3450 |

[0166] ¹ Mistura de vitamina forneceu os seguintes nutrientes por kg de dieta: vitamina A, 2.000 IU; vitamina D3, 22 IU; vitamina E, 16 mg; vitamina K, 0,1 mg; vitamina B1, 3,4 mg; vitamina B2, 1,8 mg; vitamina B6, 6,4 mg; vitamina B12, 0,013 mg; biotina, 0,17 mg; ácido pantotênico, 8,7 mg; ácido fólico, 0,8 mg; niacina, 23,8 mg.

[0167] ² Mistura de mineral forneceu os seguintes nutrientes por kg de dieta: Fe, 400 mg; Zn, 220 mg; Mn, 180 mg; Co, 1,3 mg; Cu, 21 mg; Se, 0,2 mg.

[0168] Tabela 3. Sequências de iniciador de oligonucleotídeo para qRT-PCR

| Tipo | Gene-alvo | Sequência de iniciador* (5'-3') | Tamanho de produto de PCR (Kb) |
|-----------------|-------------|---|--|
| Referência | GAPDH | F-GGTGGTGCTAAGCGTGTAT R-ACCTCTGCCATCTCTCCACA | 264 |
| Proinflamatório | IL1 β | F-TGGGCATCAAGGGCTACA R-TCGGTTGGTTGGTGATG | 244 |
| | | IL6 | F-CAAGGTGACGGAGGAGGAC R-TGGCGAGGAGGGATTTCT |
| | IL8 | F-GGCTTGCTAGGGGAAATGA R- AGCTGACTCTGACTAGGAACTGT | 200 |
| | | IL17F | F-TGAAGACTGCCTGAACCA R-AGAGACCGATTCTGATGT |
| | TNFSF 15 | F-CCTGAGTATTCCAGCAACGCA R- ATCCACCAGCTTGATGTCACTAAC | 292 |
| | | IL2 | F-TCTGGGACCCTGTATGCTCT R-ACACCAGTGGGAAACAGTATCA |
| | Th1 | IFN γ | F-AGCTGACGGTGGACCTATTATT R-GGCTTTGCGCTGGATTC |
| IL4 | | | F-ACCCAGGGCATCCAGAAG R-CAGTGCCGCAAGAAGTT |
| Th2 | | | |

| Tipo | Gene-alvo | Sequência de iniciador* (5'-3') | Tamanho de produto de PCR (Kb) |
|--------------|-----------|---|--------------------------------|
| | IL10 | F-CGGGAGCTGAGGGTGAA R-GTGAAGAAGCGGTGACAGC | 272 |
| | IL13 | F-CCAGGGCATCCAGAAGC R-CAGTGCCGGCAAGAAGTT | 256 |
| Proteínas TJ | Ocludina | F-GAGCCCAGACTACCAAAGCAA R-GCTTGATGTGGAAGAGCTTGTG | 68 |
| | ZO1 | F-CCGCAGTCGTTACGATCT R-GGAGAATGTCTGGAATGGTCTGA | 63 |
| | JAM2 | F-AGCCTCAAATGGGATTGGATT R-CATCAACTGCATTGCTTCA | 59 |
| Mucina | MUC2 | F-GCCTGCCAGAAATCAAG R-CGACAAGTTTGTGGCACAT | 59 |

[0169] Resultados

[0170] 1. Coccidiose induzida por *Eimeria maxima*

[0171] Tabela 4. Classificações de lesão em grupo desafiado por *Eimeria maxima*+

| <i>Eimeria maxima</i> | Classificação de lesão | |
|-----------------------|------------------------|------|
| | Média | SEM |
| Controle | 0 | 0 |
| Inf-Controle | 1,71 | 0,34 |
| SL 1 | 1,58 | 0,24 |
| SL 2 | 1,10 | 0,09 |
| SL 3 | 1,35 | 0,21 |
| SL 4 | 1,96 | 0,24 |
| Valor P | <0,0001 | |
| Inf-Controle vs. SL 1 | >0,9999 | |
| Inf-Controle vs. SL 2 | 0,5623 | |
| Inf-Controle vs. SL 3 | 0,9869 | |
| Inf-Controle vs. SL 4 | 0,9997 | |

[0172] Sumário: As lesões induzidas por infecção por *E. maxima* são localizadas na área intestinal intermediária e essas lesões mostram uma parede tipicamente mais espessa com exsudado tingidos com sangue mucoide nos dias 5 a 6, detritos celulares irregulares na membrana externa. As lesões são classificadas de 1 a 4 por 6 funcionários independentes.

[0173] Tabela 5. Produção (5 a 7 dpi) de Oocisto fecal (*Eimeria maxima*) no grupo desafiado por *Eimeria maxima*

| <i>Eimeria maxima</i> | Oocisto | |
|-----------------------|-----------------|-------|
| | Média | SEM |
| Controle | 0 | 0 |
| Inf-Controle | 131948 | 24088 |
| SL 1 | 104716 (↓ 21 %) | 15448 |
| SL 2 | 69128 (↓ 48 %) | 19394 |
| SL 3 | 70547 (↓ 47 %) | 15269 |
| SL 4 | 40185 (↓ 70 %) | 7489 |
| Valor P | 0,0066 | |
| Inf-Controle vs. SL 1 | 0,9578 | |
| Inf-Controle vs. SL 2 | 0,1341 | |
| Inf-Controle vs. SL 3 | 0,1529 | |
| Inf-Controle vs. SL 4 | 0,0061 | |

[0174] Os frangos infectados com *E. maxima* eliminam oocistos dos dias 5 nos 8 dias após a infecção com o máximo. Em comparação aos controles infectados não tratados, todos os grupos tratados com SL mostraram numericamente derramamento de oocisto diminuído (SL1-21 % de redução; SL2-48 % de redução, SL3-47 % de redução, SL4-70 % de redução). No entanto, apenas o tratamento SL4

mostrou redução estatisticamente significativa no derramamento de oocisto. Esse resultado indica que SL4 possui propriedade anticoccidia forte.

[0175] A Figura 1 mostra expressão de citocina pró-inflamatória em íleo nos 5 dias após a infecção por coccidiose.

[0176] Após a infecção por E. maxima, a resposta local às citocinas flutua amplamente. Esse teste foi projetado para observar a resposta de hospedeiro de ponto final visto que todas as aves foram sacrificadas nos 5 dias após a infecção por coccidiose. Nos 5 dias após a infecção por coccidiose, citocinas pró-inflamatórias semelhantes a TNF foram aumentadas em frangos infectados. O tratamento de SL não teve efeito nos níveis de TNF. Os níveis de outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-17 e IL-8 foram moduladas em alguns grupos tratados com SL, Especialmente no grupo SL4 fortemente e, em uma extensão menor, no grupo SL2 em comparação ao grupo não tratado e infectado. Esses resultados sugerem que SL4 e SL2 são lipídeos imunomoduladores.

[0177] A Figura 2 mostra expressões de citocina de Th1 e Th2 em íleo em 5 dias após infecção por coccidiose

[0178] Alguns desses SLs são imunomoduladores. SL4 estimulou IL-4 e SL2 diminuiu IL-2 induzido por coccidis, SL2 e SL3 diminuíram IL-13 induzido por coccidia.

[0179] A Figura 3 mostra expressões de proteína de junção estreita em íleo nos 5 dias após a infecção por coccidiose.

[0180] Após a coccidiose, há geralmente expressão de gene diminuída de proteínas de junção estreita. No entanto,

a dose de *Eimeria* que foi usada nesse estudo não prejudicou gravemente a expressão de proteína de junção, assim, podem ser vistos efeitos menores que se a infecção grave tivesse sido feita. Nos 2 dias após a infecção por *C. perfringens*, o SL4 aumentou a expressão de duas proteínas principais de junção, Ocludina e ZO1. O SL4 está modulando claramente a resposta benéfica do hospedeiro, controlando a expressão de importante expressão proteica após infecção por coccidiose.

[0181] Tabela 6. Níveis de glicoproteína de α -1-ácido (α -1-AGP) em soro em 5 dias após a infecção por coccidiose

| <i>Eimeria maxima</i> | Glicoproteína de α -1-ácido, ng/ml | |
|-----------------------|---|-------|
| | Média | SEM |
| Controle | 32,52 | 3,855 |
| Inf-Controle | 29,05 | 2,477 |
| SL 1 | 21,75 | 4,82 |
| SL 2 | 20,5 | 5,798 |
| SL 3 | 29,05 | 11,46 |
| SL 4 | 24,08 | 3,555 |
| Valor P | P=0,6919 | |
| Inf-Controle vs. SL 1 | 0,9995 | |
| Inf-Controle vs. SL 2 | 0,9973 | |
| Inf-Controle vs. SL 3 | >0,9999 | |
| Inf-Controle vs. SL 4 | >0,9999 | |

[0182] E a figura 4 mostra o nível de glicoproteína de α -1-ácido de soro (α -1-AGP) nos 5 dias após a coccidiose

[0183] Sumário: O kit ELISA comercial foi usado para medir os níveis de proteína de fase aguda em soro a partir de frangos infectados com *E. maxima* nos 5 dias após a infecção. Os níveis dessa glicoproteína de alfa-globulina

de plasma de fase aguda que é sintetizada no fígado refletem na situação inflamatória pós infecção. Embora estatisticamente não diferentes, as aves tratadas com SL1 e SL2 e SL4 em uma extensão menor, mostraram resposta numericamente reduzida.

[0184] 2. Enterite Necrótica

[0185] A Figura 5 mostra expressões de citocina pró-inflamatória em íleo nos 2 dias após enterite necrótica

[0186] Após a infecção por enterite necrótica, a resposta local às citocinas flutua amplamente. Portanto, a resposta cinética deve ser examinada para obter uma visão mais ampla da resposta citocina/quimiocina do hospedeiro após a infecção por NE. Esse teste foi projetado para visualizar a resposta de hospedeiro de ponto final visto que todas as aves foram sacrificadas nos 2 dias após a infecção por enterite necrótica. Nos 2 dias após a infecção por enterite necrótica, citocinas pró-inflamatórias semelhantes a TNF foram aumentadas em frangos infectados. O tratamento de SL não teve efeito nos níveis de TNF. As citocinas pró-inflamatórias de IL-6, IL-17 e IL-8 foram diminuídas nos 2 dias após a infecção por NE. SL modulou os níveis de IL-1beta, IL-6, IL-17F e IL-8 seguindo a infecção por NE com SL4 que mostra efeitos moduladores mais estranhos.

[0187] A Figura 6 mostra expressões de citocina de Th1 e Th2 em íleo nos 2 dias após a infecção por *C. perfringens*

[0188] Sumário: Nos 2 dias após a infecção por enterite necrótica, IL-2, IL-10, IL-13, IL-4 foram modulados pelo tratamento de SL. IFN-gama que promove a imunidade mediada por célula foi melhorada pelo tratamento de SL. Todos os

grupos de SL modularam os níveis de resposta de citocina com SL4 que mostra efeitos mais estranhos.

[0189] A Figura 7 mostra expressões de proteína de junção estreita em íleo nos 2 dias após a infecção por *C. perfringens*

[0190] Sumário: Após a infecção por NE, os níveis de Occuldina e ZO1 diminuíram no grupo não tratado infectado por NE devido aos danos intestinais. O tratamento de SL, especialmente SL4, melhorou a expressão dessas proteínas de junção no intestino indicando seu efeito benéfico na integridade intestinal e saúde intestinal.

[0191] Tabela 7. Níveis de glicoproteína de α -1-ácido (α -1-AGP) nos 2 dias após a infecção por *C. perfringens* (enterite necrótica) em soro

| Enterite Necrótica | Glicoproteína de α -1-ácido, ng/ml | |
|-----------------------|---|-------|
| | Média | SEM |
| Controle | 39,83 | 6,319 |
| Inf-Controle | 46,3 | 6,758 |
| SL 1 | 48,92 | 4,189 |
| SL 2 | 24,34 | 2,005 |
| SL 3 | 45,14 | 7,314 |
| SL 4 | 37,11 | 4,857 |
| Valor P | P=0,0391 | |
| Inf-Controle vs. SL 1 | >0,9999 | |
| Inf-Controle vs. SL 2 | 0,1089 | |
| Inf-Controle vs. SL 3 | >0,9999 | |
| Inf-Controle vs. SL 4 | 0,9861 | |

[0192] e a Figura 8 mostra glicoproteína de α -1-ácido (α -1-AGP) no soro

[0193] O kit ELISA comercial foi usado para medir níveis de proteína de fase aguda em soro a partir de frangos afetados com enterite necrótica nos 2 dias após a infecção por *Clostridium perfringens*. Os níveis dessa glicoproteína de alfa-globulina de plasma de fase aguda que é sintetizada no fígado refletem na situação inflamatória após a infecção do fígado. O grupo SL2 mostrou resposta numericamente reduzida. Esse resultado indica que SL2 tem capacidade para modular a inflamação.

[0194] Será compreendido que cada um dos elementos descritos acima, ou dois ou mais juntamente, também pode ter uma aplicação útil em outros tipos de métodos diferentes do tipo descrito acima. Sem análise adicional, o que foi dito acima revelará, então, totalmente a essência da presente revelação que outras pessoas podem, ao aplicar o conhecimento atual, adaptar prontamente para várias aplicações sem omitir recursos que, a partir do ponto de vista da técnica anterior, constituem adequadamente características essenciais dos aspectos genéricos ou específicos desta revelação estabelecida nas reivindicações anexas. As modalidades anteriores são apresentadas com fins exemplificativos apenas; o escopo da presente revelação deve ser limitado apenas pelas seguintes reivindicações.

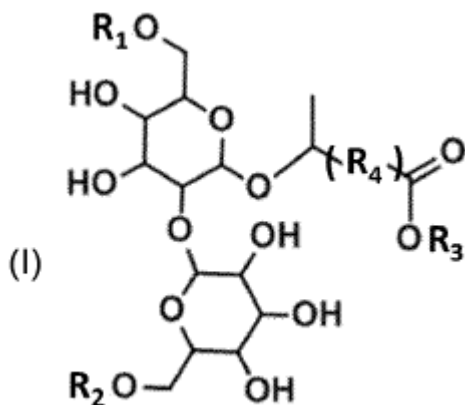
REIVINDICAÇÕES

1. Método para a modulação da flora intestinal e/ou para reforçar a função de sistema imunológico em animais **caracterizado por** compreender a administração de um ou mais soforolipídeos para um animal com necessidade dos mesmos.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de que o animal é um animal avícola selecionado a partir do grupo que consiste em galinhas, frangos de corte, frangos, galinha e pintos.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, para alívio, cura ou prevenção de coccidiose e de doenças causadas por clostridium sp., **caracterizado por** compreender administrar um aditivo para ração ou composição de pré-mistura que compreende um ou mais soforolipídeos ao animal.

4. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado pelo** fato de que o um ou mais soforolipídeos é um soforolipídeo de fórmula (I),



em que:

R₁ e R₂ são, independentemente, H ou acetila;

R₃ é um grupo C₁ - C₈ alquila; e

R₄ é uma unidade de alcano linear, ramificada, saturada ou insaturada que compreende de 6 a 24 átomos de carbono e derivados dos mesmos.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado pelo** fato de que o um ou mais soforolipídeos é selecionado a partir do grupo que consiste em: etil-17-L-[(2'-0-β-D-glucopiranosil-β-D-glucopiranosil)-oxi]-cis-9-octadecenoato-6"-acetato; etil-17-L-[(2'-0-β-D-glucopiranosil-β-D-glucopiranosil)-oxi]-cis-9-octadecenoato-6'-acetato; etil-17-L-[(2'-0-β-D-glucopiranosil-β-D-glucopiranosil)-oxi]-cis-9-octadecenoato-6'-6"-diacetato; butil-17-L-[(2'-0-β-D-glucopiranosil-β-D-glucopiranosil)-oxi]-cis-9-octadecenoato-6"-acetato; butil-17-L-[(2'-0-β-D-glucopiranosil-β-D-glucopiranosil)-oxi]-cis-9-octadecenoato-6'-acetato; e butil-17-L-[(2'-0-β-D-glucopiranosil-β-D-glucopiranosil)-oxi]-cis-9-octadecenoato-6'-6"-diacetato.

6. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado pelo** fato de que o um ou mais soforolipídeos são administrados ao animal na forma de um aditivo para ração ou pré-mistura para composição de ração.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado pelo** fato de que a pré-mistura para composição de ração compreende adicionalmente um ou mais componentes selecionados a partir da lista que consiste em:

- a) um ou mais carreadores;
- b) uma ou mais enzimas adicionais;
- c) um ou mais micróbios;

- d) uma ou mais vitaminas;
- e) um ou mais minerais;
- f) um ou mais aminoácidos;
- g) um ou mais ácidos orgânicos; e
- h) um ou mais outros ingredientes de ração.

8. Composição de pré-mistura para animal **caracterizada por** compreender pelo menos um soforolípídeo conforme definido nas reivindicações 6 ou 7 e pelo menos um componente adicional selecionado a partir do grupo que consiste em

- a) pelo menos uma vitamina solúvel em gordura e/ou
- b) pelo menos uma vitamina solúvel em água, minerais residuais e/ou
- c) pelo menos um mineral.

9. Composição de pré-mistura para animal, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizada por** compreender um ou mais componentes selecionados a partir da lista que consiste em:

- a) um ou mais aminoácidos;
- b) um ou mais prébióticos;
- c) um ou mais ácidos orgânicos;
- d) uma ou mais enzimas adicionais;
- e) um ou mais probióticos.

10. Composição de ração animal **caracterizada por** ter um teor bruto de proteína de 50 a 800 g/kg de ração e que compreende pelo menos um soforolípídeo conforme definido em qualquer uma das reivindicações 8 ou 9 ou uma pré-mistura que contém soforolípídeo conforme definida em qualquer uma das reivindicações 7 a 9.

Figura 1

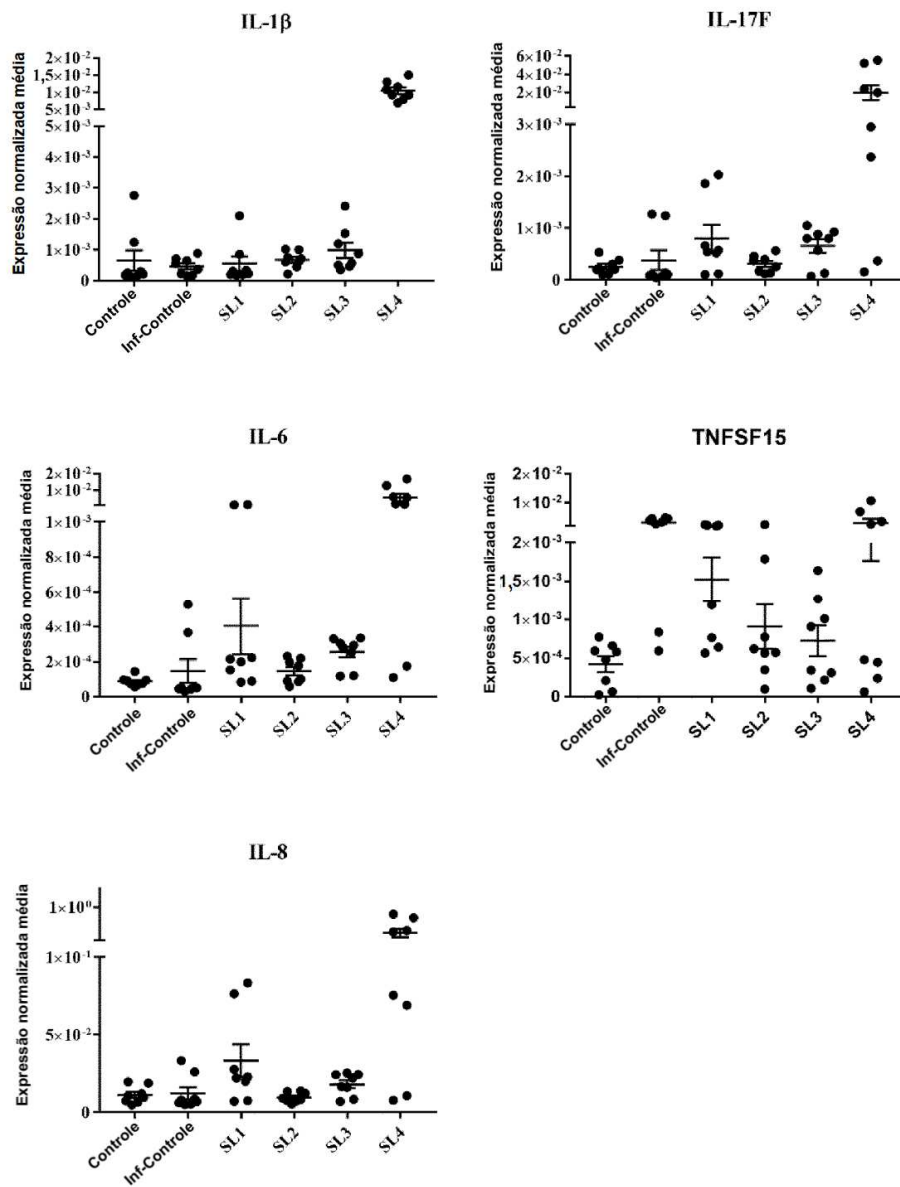


Figura 2

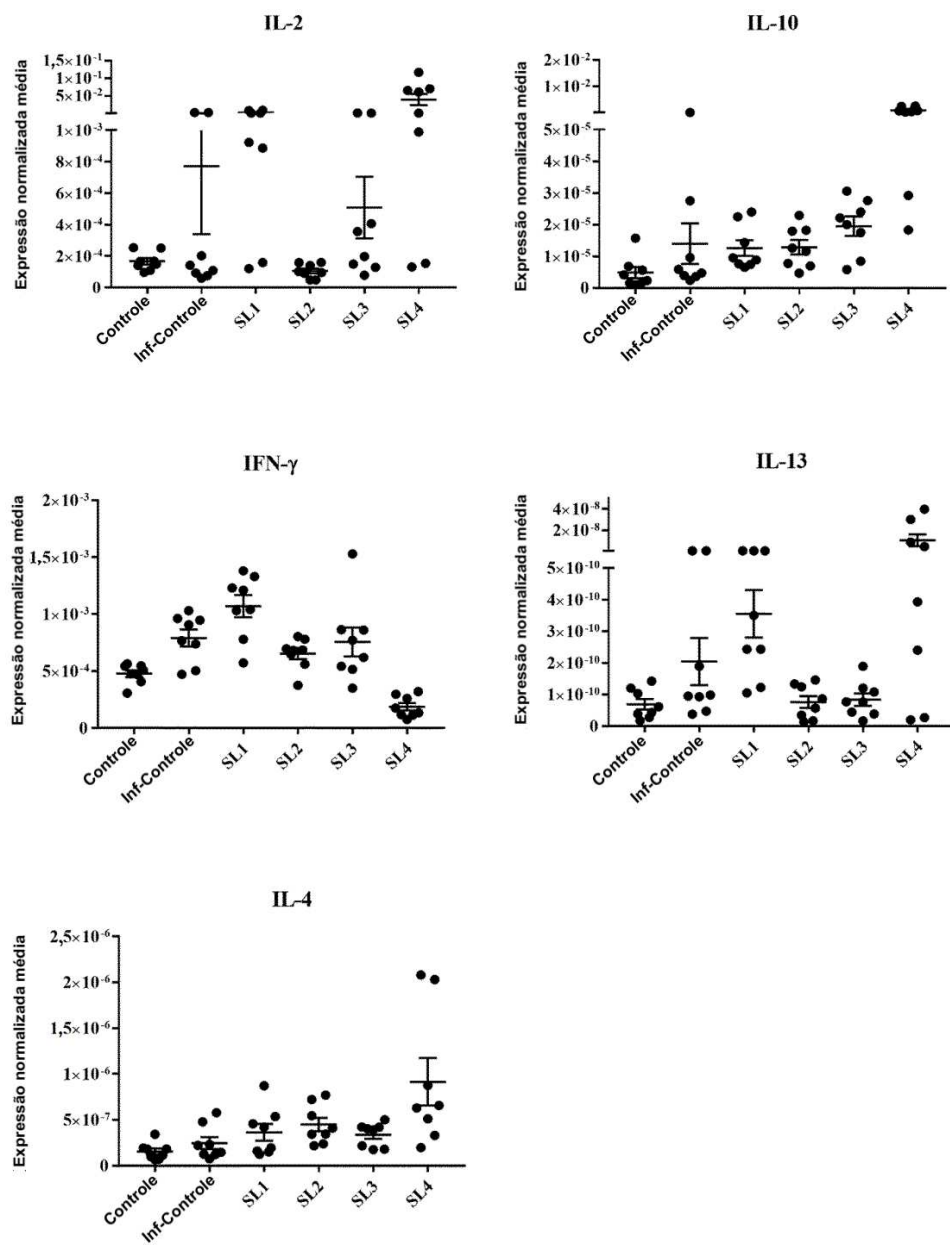


Figura 3

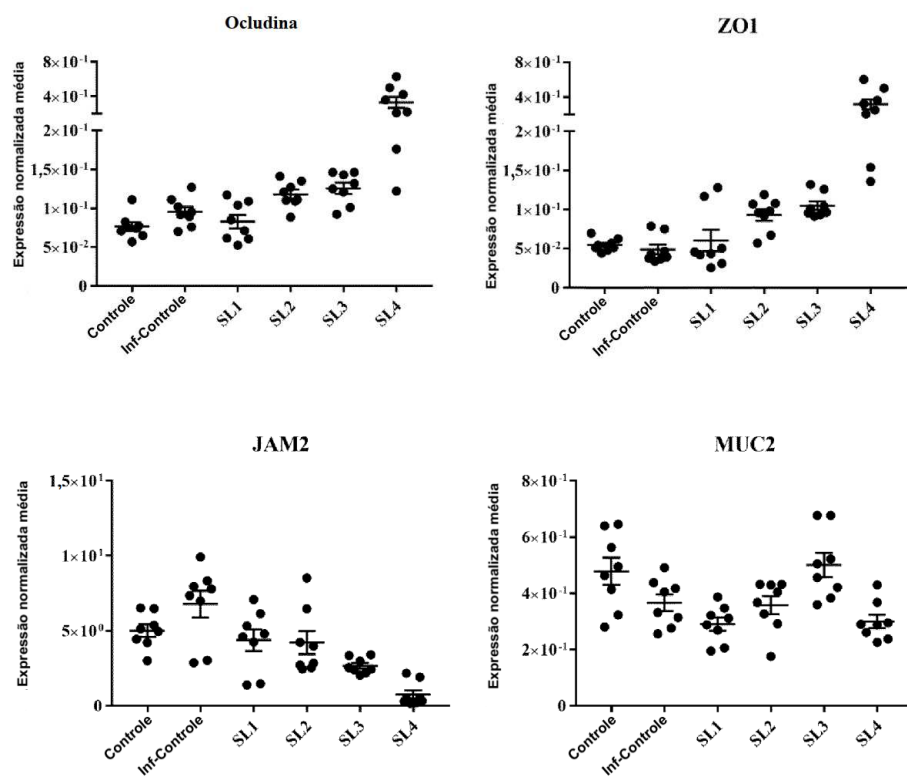


Figura 4

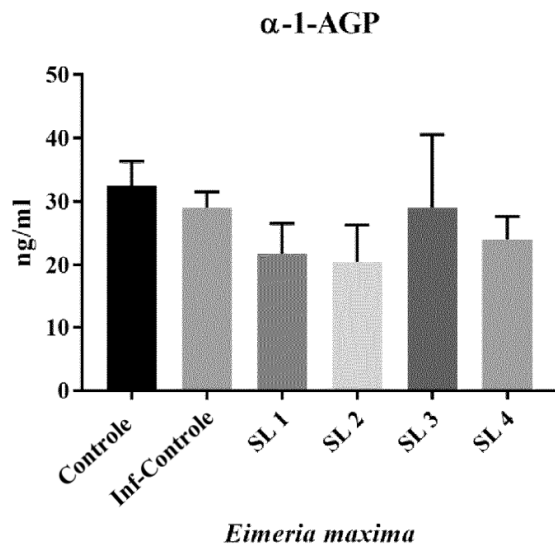


Figura 5

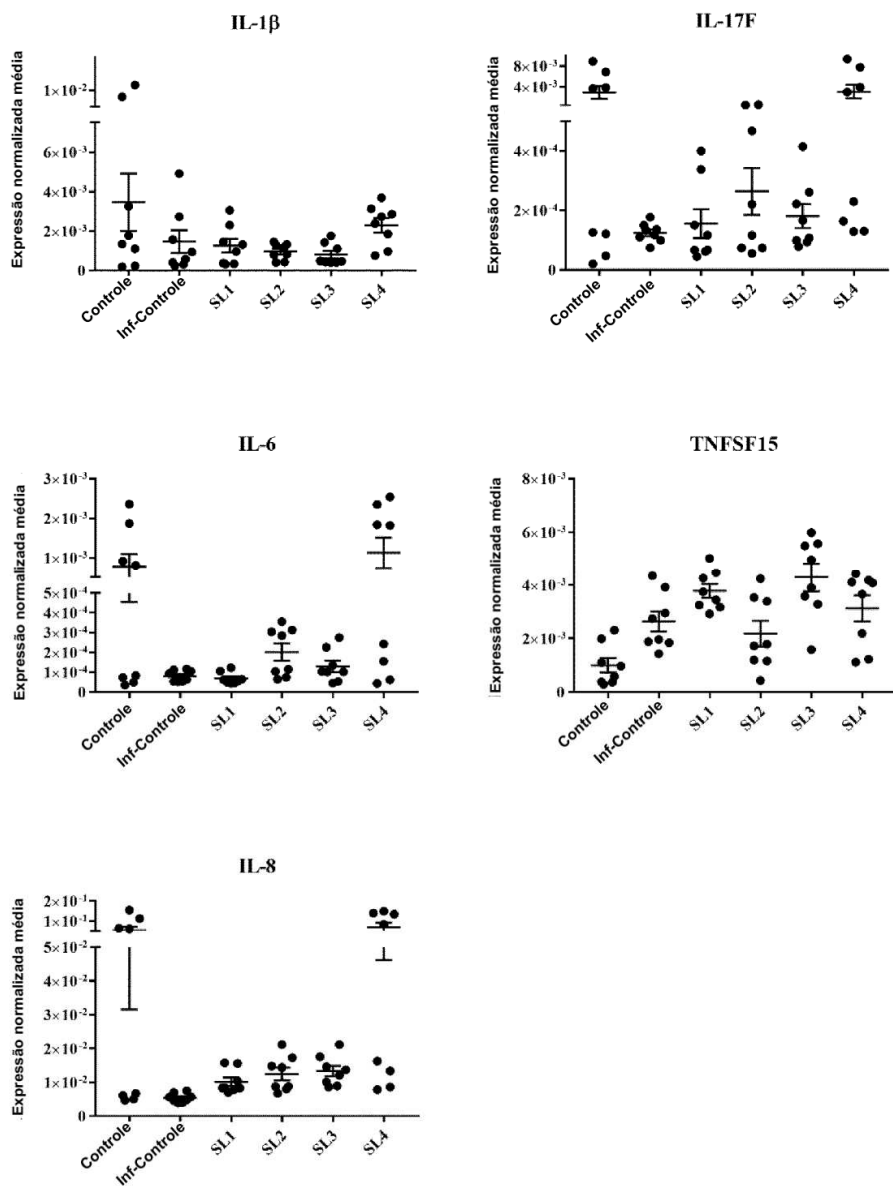


Figura 6

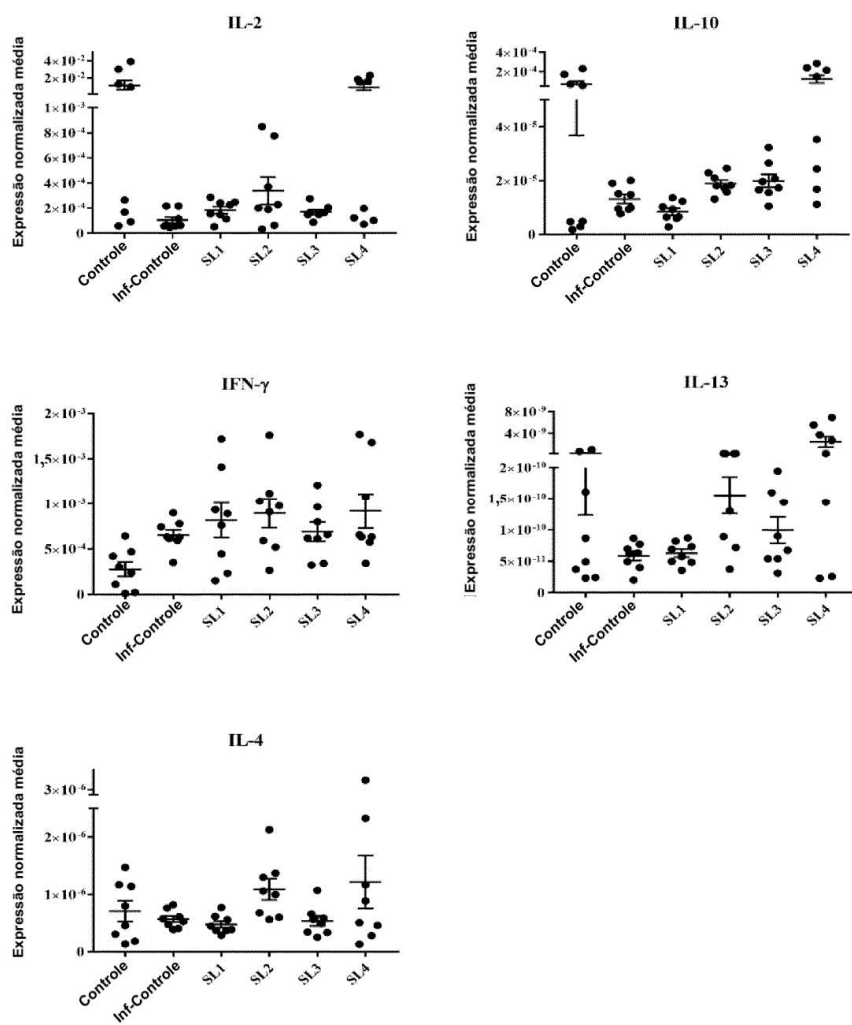


Figura 7

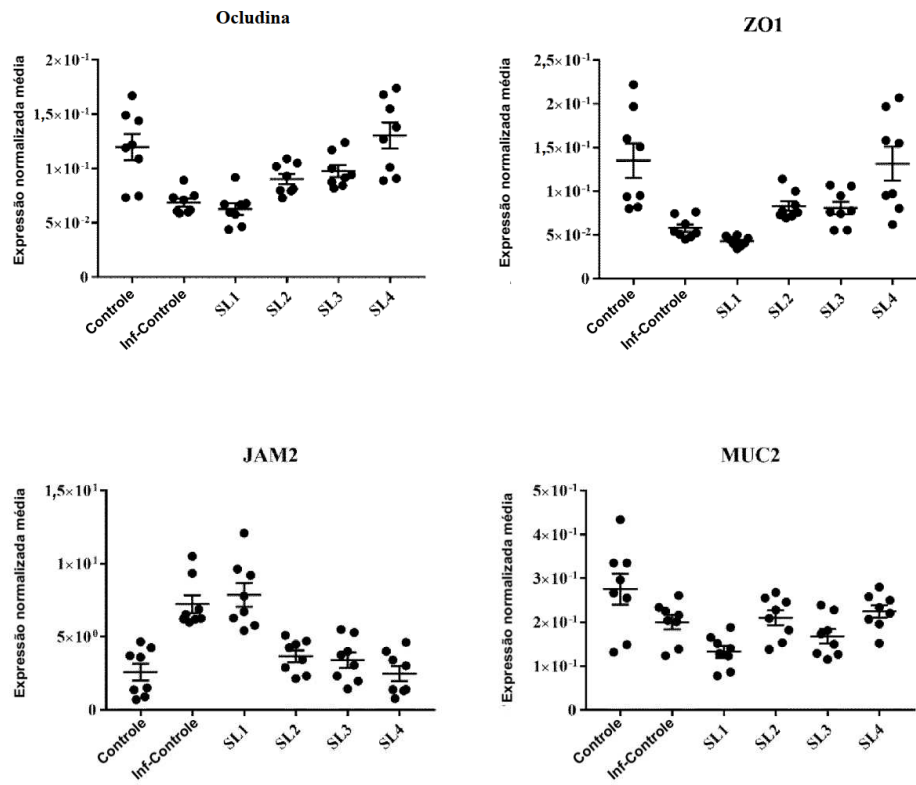
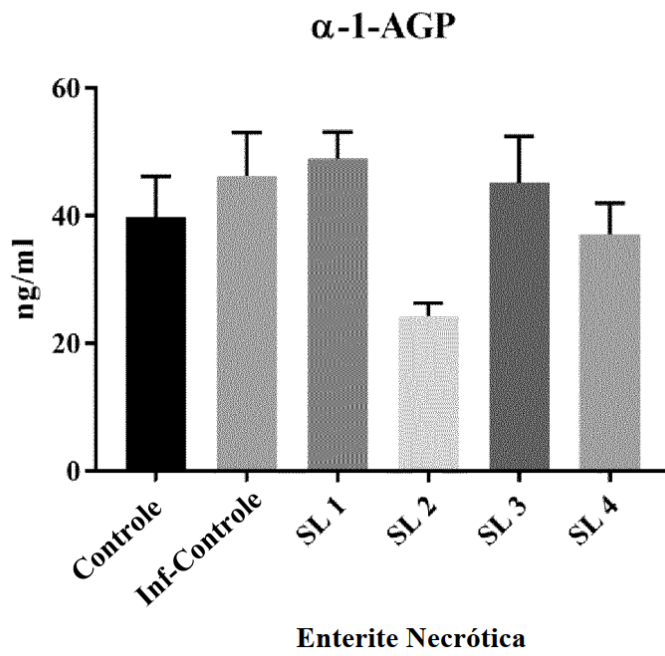


Figura 8



RESUMO

"USO DE SOFOROLIPÍDEOS COMO ADITIVO PARA RAÇÃO"

A invenção se refere a métodos para modulação da flora intestinal e/ou para reforçar a função de sistema imunológico em animais compreendendo a administração de um ou mais soforolipídeos a um animal com necessidade dos mesmos. Também são fornecidas composições de ração animal que compreendem soforolipídeos.