

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 106**

51 Int. Cl.:

A23K 1/16 (2006.01)

A23K 1/17 (2006.01)

A23K 1/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2012 E 12723693 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2015 EP 2713766**

54 Título: **Uso de una composición de pienso para reducir la emisión de metano en rumiantes, y/o para mejorar el rendimiento de rumiantes**

30 Prioridad:

26.05.2011 EP 11167748

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

01.10.2015

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:

**DUVAL, STEPHANE;
IMMIG, IRMGARD;
KINDERMANN, MAIK y
WEBER, GILBERT**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 547 106 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

Uso de una composición de pienso para reducir la emisión de metano en rumiantes, y/o para mejorar el rendimiento de rumiantes

5 La presente invención se refiere al campo de la reducción de la emisión de metano en rumiantes. Particularmente, se refiere al uso de una composición de pienso o un aditivo de pienso que comprende al menos un antibiótico y al menos una molécula orgánica sustituida en cualquier posición con al menos un grupo nitrooxi, para reducir la producción de metano que emana de las actividades digestivas de los rumiantes, y/o para mejorar el rendimiento del rumiante.

10 La presente invención también se refiere a pienso animal o composiciones de pienso animal y aditivos de pienso que comprenden las moléculas mencionadas anteriormente. El término pienso o la expresión composición de pienso significa cualquier compuesto, preparación, mezcla, o composición adecuada o destinada para la ingesta por parte de un animal.

15 En el presente contexto, un rumiante es un mamífero del orden de los artiodáctilos que digiere comida basada en plantas ablandando inicialmente la misma en el primer estómago del animal, conocido como rumen, regurgitando a continuación la masa semidigerida, ahora conocida como bolo alimenticio, y masticando la misma de nuevo. El proceso de masticar de nuevo el bolo alimenticio para descomponer adicionalmente la materia de las plantas y estimular la digestión se denomina "rumiar".

20 La fermentación en el rumen presenta algunas desventajas. Se produce metano como consecuencia natural de la fermentación anaerobia, lo que representa una pérdida de energía para el animal hospedador. Los carbohidratos componen de un 70 a un 80 % de la materia seca de una ración diaria habitual de ganado y a pesar de esto la absorción de carbohidratos desde el tracto gastrointestinal está normalmente muy limitada. La razón de esto es la amplia fermentación de los carbohidratos en el rumen que da como resultado la producción de acetato, propionato y butirato como productos principales. Estos productos son parte de los denominados ácidos grasos volátiles (VFA).

25 Además de la pérdida de energía, el metano es también un gas de invernadero, que es muchas veces más potente que el CO₂. Su concentración en la atmósfera se ha doblado durante el último siglo y continúa aumentando de forma alarmante. Los rumiantes son los principales contribuidores a la formación de metano biogénico, y se ha estimado que la prevención de la formación de metano por parte de los rumiantes casi estabilizaría las concentraciones atmosféricas de metano.

30 Además, la valoración del protocolo de Kyoto seguido de la cumbre climática de Copenhague de 2009 sitúa un aumento de prioridad en la disminución de las emisiones de metano como parte de una estrategia de múltiples gases.

35 Se ha mostrado que los antibióticos y más particularmente los ionóforos reducen ligeramente la producción de metano en rumiantes (Guan *et al.* 2006, Journal de Animal Science; 84: 1896-1906). Sin embargo, el efecto de los antibióticos en la formación de metano tiene algunas desventajas debido a la rápida adaptación de la flora microbiana y/o al desarrollo de resistencias que conducen a la pérdida completa del efecto pretendido en un corto período de tiempo (2 a 3 semanas), y como consecuencia se ha prohibido el uso de antibióticos en Europa para uso no terapéutico.

40 Se han publicado recientemente (documento de Patente WO 2010/072584) productos no antibióticos (derivados de ácidos biliares) que conducen a la reducción de la emisión de metano, cuando se someten a ensayo usando un modelo de simulación de rumen *in vitro*. Sin embargo, la cantidad requerida para producir una reducción moderada de la emisión de metano no es compatible con las restricciones de coste de la industria de pienso de rumiantes.

45 Además, se han descrito numerosos extractos de plantas naturales (ajo: documento de Patente WO 2009/150264, yuca, canela, ruibarbo...) en la literatura científica como soluciones potentes para reducir la emisión de metano en rumiantes basándose en experimentos *in vitro*. Sin embargo, ninguna de estas soluciones se ha convertido en un producto comercial debido a efectos secundarios (residuos en la leche), debido a la falta de eficacia cuando se someten a ensayo *in vivo*, o debido a la cantidad muy elevada de aditivo que se necesita suministrar al animal para generar una reducción de metano significativa.

50 Finalmente, se ha mostrado que los nitrocompuestos tales como nitropropanol, ácido nitropropiónico, nitroetano o nitroetanol reducen la emisión de metano en rumiantes (Anderson *et al.*, 2008 Bioresource Technology; 99: 8655-8661).

55 En estas circunstancias existe aún la necesidad de desarrollar nuevas sustancias y composiciones que reduzcan la formación de metano producido por rumiantes. Además de reducir la emisión de metano, tales composiciones también pueden contribuir a mejorar el rendimiento del rumiante al mejorar la proporción de conversión de pienso, reducir la ingesta de pienso, mejorar la ganancia de peso, y/o mejorar la res muerta, o el rendimiento de leche.

5 Sorprendentemente, los presentes inventores acaban de descubrir que la composición que se especifica posteriormente en el presente documento, tiene un gran potencial para su uso en pienso animal con el fin de reducir básicamente la formación de metano sin afectar la fermentación microbiana de un modo que sería perjudicial para el animal hospedador. Además, los compuestos de la presente invención también presentan un gran beneficio con respecto al rendimiento global del animal según se mide mediante la proporción acetato/propionato ruminal, la proporción de conversión de pienso, la ingesta de pienso, la ganancia de peso, el rendimiento de res muerta, o el rendimiento de leche. Dichas composiciones también son más estables que las descritas en la técnica anterior, más seguras para el animal y el ser humano, conducen a un efecto de reducción de metano persistente, no afectan a la palatabilidad, se pueden producir a escala industrial a un coste compatible con la industria de nutrición animal y, por encima de todo, no provocan la acumulación de ningún metabolito en la leche o carne del animal suplementado, y son activas a concentraciones muy bajas en el rumen.

15 Por lo tanto, la presente invención proporciona el uso de una composición de pienso o aditivo de pienso que comprende al menos un antibiótico, al menos una molécula orgánica sustituida en cualquier posición con al menos un grupo nitrooxi, o una sal de la misma como se define mediante la fórmula (I) para reducir la formación de metano que emana de las actividades digestivas de rumiantes y/o para mejorar el rendimiento del rumiante.

20 La invención también proporciona un método para reducir la producción del metano que emana de las actividades digestivas de rumiantes y/o para mejorar el rendimiento del animal rumiante, que comprende administrar por vía oral al animal una cantidad suficiente de una composición de pienso o aditivo de pienso que comprende al menos un antibiótico, y al menos una molécula orgánica sustituida en cualquier posición con al menos un grupo nitrooxi, o una sal del mismo como se define mediante la fórmula (I) al animal. Se ha de entender por administración oral la alimentación sencilla o la administración manual de un bolo.

25 En todas las realizaciones de la presente invención, las moléculas orgánicas sustituidas en cualquier posición con al menos un grupo nitrooxi, o las sales de las mismas se definen mediante la siguiente fórmula (I):



30 en la que Y es una molécula orgánica de la siguiente composición: $\text{C}_a\text{H}_b\text{O}_d\text{N}_e\text{S}_g$, en la que

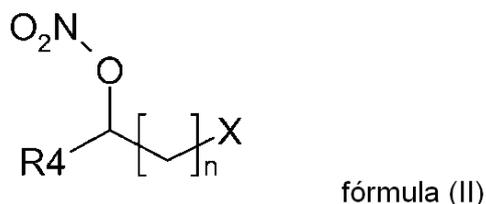
- a está comprendido entre 1 y 25, preferentemente entre 1 y 10,
- b está comprendido entre 2 y 51, preferentemente entre 2 y 21,
- 35 d está comprendido entre 0 y 8, preferentemente entre 0 y 6,
- e está comprendido entre 0 y 5, preferentemente entre 0 y 3,
- g está comprendido entre 0 y 3, preferentemente entre 0 y 1.

40 Más preferentemente, en todas las realizaciones de la presente invención, la molécula orgánica de fórmula (I) es de la siguiente composición $\text{C}_a\text{H}_b\text{O}_d\text{N}_e\text{S}_g$, en la que

- a está comprendido entre 1 y 10,
- b está comprendido entre 2 y 21,
- 45 d está comprendido entre 0 y 6,
- e está comprendido entre 0 y 3,
- g está comprendido entre 0 y 1.

50 En otra realización, los compuestos preferentes de fórmula (I) de acuerdo con la presente invención son compuestos en los que b está comprendido entre 3 y 51, preferentemente, b está comprendido entre 3 y 21.

En otra realización, los compuestos preferentes de fórmula (I) de acuerdo con la presente invención son compuestos de fórmula (II),



55 en la que

n está comprendido entre 0 y 12, comprendido preferentemente entre 0 y 6 y, en la que, si $n \neq 0$, la cadena de carbono es una cadena de carbono alifática lineal, cíclica, o ramificada que puede estar sin sustituir o sustituida con hasta 3 grupos hidroxilo, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino o nitrooxi, o una cadena de carbono de alquenilo, o alquinilo mono o poliinsaturada y en cualquier forma isomérica,

R4 es independientemente, hidrógeno o una cadena lineal, cíclica, o ramificada saturada de un grupo alquilo o alquenilo que contiene de 1 a 12, preferentemente de 1 a 6 átomos de carbono,

X es hidrógeno, R5, $R5=N$, $-OR5$, $-OCOR5$, $-NR5R6$, $-ONO_2$, $-COOR5$, $-CONR5R6$, $-NHSO_2R5$, o $-SO_2NHR5$,

R5 y R6 son independientemente, hidrógeno, cadena de alquilo C1-C12 lineal, ramificada o cíclica, sin sustituir o sustituida con hasta 3 grupos hidroxilo, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino o nitrooxi, cadena de alquenilo, o alquinilo que puede estar mono o poliinsaturada, y en cualquier forma isomérica.

Para todas las realizaciones de la presente invención, se ha de entender que los compuestos de fórmula (I) y los compuestos de fórmula (II) pueden estar en cualquier forma isomérica.

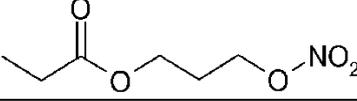
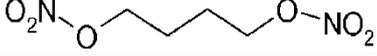
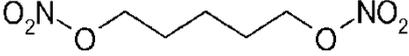
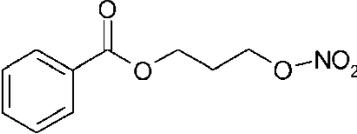
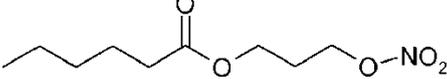
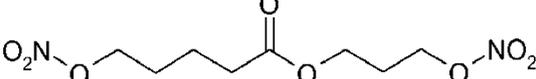
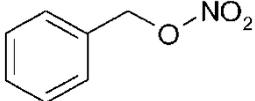
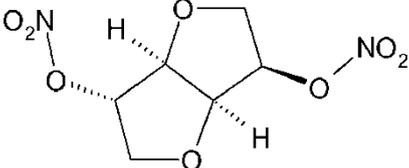
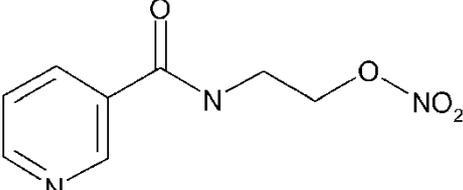
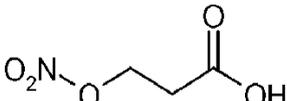
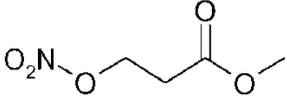
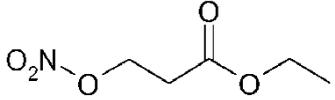
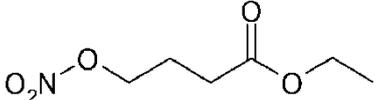
Se ha de entender en la definición anterior de los compuestos de fórmula (II) que cuando $n > 2$, la cadena de carbono puede ser lineal o estar ramificada en cualquier posición a lo largo de la cadena de carbono. Además, la cadena de carbono puede estar ramificada con múltiples ramificaciones en diferentes posiciones a lo largo de la cadena de carbono. Además, cuando $n > 3$, la cadena de carbono alifática puede formar un resto cíclico. Este resto cíclico puede portar el resto nitrooxi en cualquier posición (2, 3, 4), y también puede estar ramificado en múltiples posiciones con cualquier grupo alifático. Los grupos alifáticos ramificados son preferentemente, metilo, etilo o propilo. Además, la cadena de carbono puede estar sustituida además con hasta 3 grupos hidroxilo, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino o nitrooxi.

En la definición anterior de los derivados de fórmula (II) un grupo alquilo preferente es metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo, isobutilo, pentilo, neopentilo, hexilo, ciclohexilo, y 2-etil-hexilo y octilo. Además, cualquier grupo alquilo o alquenilo que contiene tres o más átomos de carbono puede ser de cadena lineal, ramificado, o cíclico. Además, para la cadena lineal o el grupo alquenileno C_2-C_{10} ramificado, esto se entiende que incluye grupos alquenileno con uno o (desde C_4) más dobles enlaces; algunos ejemplos de tales grupos alquenileno son los de fórmulas $-CH=CH-$, $-CH=CH-CH_2-$, $-CH=CH-(CH_2)_3-$ y $-(CH=CH)_2-$.

En otra realización, los compuestos más preferentes de fórmula (I) de acuerdo con la presente invención se seleccionan entre la lista de compuestos, y las sales de los mismos que se enumeran con sus fórmulas químicas en la Tabla 1.

Tabla 1: compuestos preferentes de fórmula (I) de acuerdo con la presente invención

Identificador de comp.	Estructura molecular	Nombre químico
1		3-Nitrooxipropanol
2		Dinitrato de rac-4-fenilbutano-1,2-diilo
3		2-(Hidroximetil)-2-(nitrooximetil)-1,3-propanodiol
4		N-Etil-3-nitro-oxipropiónico sulfonil amida
5		5-Nitrooxi-pentanonitrilo
6		5-Nitrooxi-pentano

Identificador de comp.	Estructura molecular	Nombre químico
7		Propionato de 3-nitro-oxi-propilo
8		1,3-bis-Nitrooxipropano
9		1,4-bis-Nitrooxibutano
10		1,5-bis-Nitrooxipentano
11		Benzoato de 3-nitro-oxi-propilo
12		Hexanoato de 3-nitro-oxi-propilo
13		5-Nitro-oxi-hexanoato de 3-nitro-oxi-propilo
14		Nitrato de bencilo
15		Dinitrato de isosorbida
16		N-[2-(Nitrooxi)etil]-3-piridinacarboxamida
17		Ácido 3-nitrooxi propiónico
18		3-Nitrooxi propionato de metilo
19		3-Nitrooxi propionato de etilo
20		4-Nitrooxi butanoato de etilo

Identificador de comp.	Estructura molecular	Nombre químico
21		3-Nitrooxi butanoato de etilo
22		Ácido 5-nitrooxi pentanoico
23		5-Nitrooxi pentanoato de etilo
24		Ácido 6-nitrooxi hexanoico
25		6-Nitrooxi hexanoato de etilo
26		4-Nitrooxi-ciclohexilcarboxilato de etilo
27		Ácido 8-nitrooxi octanoico
28		8-Nitrooxi octanoato de etilo
29		Ácido 11-nitrooxi undecanoico
30		11-Nitrooxi undecanoato de etilo
31		5-nitrooxi-pentanoico amida
32		5-nitrooxi-N-metil-pentanoico amida

En otra realización, los compuestos incluso más preferentes de fórmula (I) se seleccionan entre la lista de compuestos, y las sales de los mismos, que comprende 3-nitrooxipropanol, 3-nitrooxi propionato de etilo, 3-nitrooxi propionato de metilo, y ácido 3-nitrooxi propiónico.

5

Los compuestos de fórmula (I) de la presente invención también comprenden las sales de la molécula nitrooxi orgánica. Los cationes preferentes para la preparación de la sal se pueden seleccionar entre el grupo que consiste en sodio (Na⁺), potasio (K⁺), litio (Li⁺), magnesio (Mg²⁺), calcio (Ca²⁺), bario (Ba²⁺), estroncio (Sr²⁺), y amonio (NH₄⁺). Las sales también se pueden preparar a partir de un metal alcalino o un metal alcalinotérreo.

10

Los compuestos de fórmula (I) de acuerdo con la presente invención se pueden fabricar en principio de acuerdo con métodos sintéticos conocidos por sí mismos para moléculas nitrooxi orgánicas, y/o basándose en los métodos que se describen en el documento de Patente PCT/EP2010/069338, y en el documento de solicitud de patente Europea N° 10 195 857.7.

En todos los casos los expertos en la materia pueden seleccionar métodos apropiados para purificar el producto (compuestos de fórmula (I)), es decir, mediante cromatografía en columna, o el compuesto de fórmula (I) se puede aislar y purificar por métodos conocidos por sí mismos, por ejemplo por adición de un disolvente tal como dietil éter o acetato de etilo para inducir la separación del producto en bruto de la mezcla después de la reacción, y secado sobre Na₂SO₄ del producto en bruto recogido.

Los antibióticos son sustancias que eliminan o ralentizan el crecimiento de los microorganismos. Como clases de antibióticos específicos, los ionóforos se definen generalmente como sustancias que facilitan la translocación de un ion a través de una barrera lipídica tal como una membrana celular.

En una realización particular de la presente invención, el al menos un antibiótico se selecciona entre el grupo que consiste en monensina, lasalocid, narasina, maduramicina, semduramicina, salinomycin, avoparcina, actaplanina, y penicilina. Más preferentemente, los compuestos más adecuados para la presente invención son ionóforos, e incluso lo más preferentemente, el antibiótico es monensina (Rumensin) o lasalocid (Bovatec). Ambos ionóforos están disponibles en Elanco y Alpharma, respectivamente.

La emisión de metano por parte de los rumiantes se puede medir fácilmente en animales individuales en cámaras metabólicas mediante métodos conocidos en la técnica (Grainger *et al.*, 2007 J. Dairy Science; 90: 2755-2766). Además, también se puede evaluar en el granero mediante una nueva tecnología que usa un haz láser (McGinn *et al.*, 2009, Journal de Environmental Quality; 38: 1796-1802). Alternativamente, también se puede evaluar el metano producido por un rumiante diariamente por medición de los perfiles de ácidos grasos en la leche de acuerdo con el documento de Patente WO 2009/156453.

El rendimiento del rumiante se puede evaluar mediante métodos bien conocidos en la técnica, y se caracteriza habitualmente mediante la proporción de conversión de pienso, ingesta de pienso, rendimiento de res muerta, o rendimiento de leche.

La presente invención también se refiere al uso de una composición de pienso o aditivo de pienso que comprende al menos un antibiótico, y al menos una molécula orgánica sustituida en cualquier posición con al menos un grupo nitrooxi, o una sal de la misma como se define mediante la fórmula (I) junto con al menos una sustancia activa adicional que muestra efectos similares con respecto a la formación de metano en el rumen y que se selecciona entre el grupo que consiste en disulfuro de dialilo, aceite de ajo, isotiocianato de alilo, ácido desoxicólico, ácido quenodesoxicólico y los derivados de los mismos.

Otros componentes que se podrían dar junto con el compuesto de acuerdo con la presente invención son, por ejemplo, levaduras, extractos de orégano, y aceites esenciales, por ejemplo, timol, 3-metilfenol, vainillina, guaiacol y eugenol.

Actualmente se contempla que el disulfuro de dialilo, aceite de ajo, isotiocianato de alilo, ácido desoxicólico, ácido quenodesoxicólico y los derivados de los mismos se administren independientemente en intervalos de dosificación, por ejemplo, de 0,01-500 mg de sustancia activa por kg de pienso (ppm). Estos compuestos están disponibles en el mercado o se pueden preparar fácilmente por un experto en la materia usando procesos y métodos bien conocidos en la técnica anterior.

Algunos mamíferos rumiantes de acuerdo con la presente invención incluyen reses, cabras, ovejas, jirafas, bisontes americanos, bisontes europeos, yaks, búfalos de agua, venados, camellos, alpacas, llamas, ñus, antílopes, antílopes americanos y nilgós.

Para todas las realizaciones de la presente invención, las reses domésticas, ovejas y cabras son especies más preferentes. Para los presentes fines las especies más preferentes son las reses domésticas. El término incluye todas las razas de reses domésticas, y todos los tipos de producción de las reses, en particular vacas lecheras y ganado vacuno.

La presente invención también se refiere al uso de una composición de pienso o aditivo de pienso que comprende al menos un antibiótico, y al menos una molécula orgánica sustituida en cualquier posición con al menos un grupo nitrooxi, o una sal de la misma como se define mediante la fórmula (I), en el que la producción de metano en rumiantes calculada en litros por kilogramo de ingesta de materia seca se reduce en al menos un 10 % cuando se mide en cámaras metabólicas. Preferentemente, la reducción de metano es al menos un 15 %, más preferentemente, al menos un 20 %, incluso más preferentemente, al menos un 25 %, lo más preferentemente, al menos un 30 %. También se pueden usar medidas alternativas de la emisión de metano tales como el uso de un haz láser o, para rumiantes lecheros, la correlación de la producción de metano con el perfil de VFA en la leche.

5 La presente invención también se refiere al uso de una composición de pienso o un aditivo de pienso que comprende al menos un antibiótico, y al menos una molécula orgánica sustituida en cualquier posición con al menos un grupo nitrooxi, o una sal de la misma como se define mediante la fórmula (I), en el que la proporción de conversión de pienso del rumiante se reduce en al menos un 1 % cuando se mide en un ensayo de rendimiento convencional. Preferentemente, la proporción de conversión de pienso se reduce en al menos un 2 %, más preferentemente, en al menos un 2,5 %, incluso más preferentemente, en al menos un 3 %, lo más preferentemente, en al menos un 3,5 %.

10 En la cría de animales, la expresión proporción de conversión de pienso (FCR), es una medida de la eficacia del animal en la conversión de masa de pienso en un aumento de masa corporal. Específicamente, FCR es la masa del pienso ingerido dividida por la ganancia de masa corporal, todo durante un período de tiempo especificado. FCR es adimensional.

15 La presente invención también se refiere al uso de una composición de pienso o aditivo de pienso que comprende al menos un antibiótico, y al menos una molécula orgánica sustituida en cualquier posición con al menos un grupo nitrooxi, o una sal de la misma como se define mediante la fórmula (I), en el que la cantidad de la molécula orgánica como se define en la fórmula (I) administrada al animal rumiante es de 1 mg a 10 g por kg de pienso, preferentemente de 10 mg a 1 g por kg de pienso, más preferentemente, de 50 mg a 500 mg por kg de pienso, y la cantidad de antibiótico administrado al animal rumiante es de 0,5 a 150 mg por kg de pienso, preferentemente de 5 a 20 mg por kg de pienso. Sin embargo, para el uso en pienso animal, las moléculas orgánicas sustituidas en cualquier posición con al menos un grupo nitrooxi, o las sales de las mismas como se definen mediante la fórmula (I) no necesitan ser puras; por ejemplo, pueden incluir otros compuestos y derivados.

25 La presente invención también se refiere al uso de una composición de pienso o aditivo de pienso que comprende al menos un antibiótico, y al menos una molécula orgánica sustituida en cualquier posición con al menos un grupo nitrooxi, o una sal de la misma como se define mediante la fórmula (I), en el que la proporción en peso de molécula orgánica como se define en la fórmula (I)/antibiótico en la composición de pienso o aditivo de pienso está comprendida entre 0,05 y 50, preferentemente entre 0,1 y 10, más preferentemente entre 0,5 y 5.

30 El pienso o los aditivos de pienso de ruminantes se pueden preparar mediante métodos conocidos por sí mismos en la técnica de la formulación y el procesamiento de pienso.

35 Por lo tanto, otros aspectos de la presente invención son formulaciones, es decir aditivos de pienso y composiciones de pienso animal que contienen composiciones como se han definido anteriormente en el presente documento.

40 Por lo tanto, la presente invención también se refiere a una composición de pienso o un aditivo de pienso que comprende al menos un antibiótico y al menos un compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo. En una realización preferente, la composición es una premezcla mineral, una premezcla de vitaminas que incluye vitaminas y minerales o un bolo.

45 La dosificación diaria normal de una composición de acuerdo con la invención proporcionada a un animal mediante ingesta de pienso depende del tipo de animal y su condición. Normalmente, esta dosificación debería estar en el intervalo de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 g, preferentemente de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1 g, más preferentemente, de 50 mg a 500 mg del compuesto por kg de pienso.

50 La composición que comprende al menos un antibiótico y al menos una molécula orgánica sustituida en cualquier posición con al menos un grupo nitrooxi, o una sal de la misma como se define mediante la fórmula (I) se puede usar junto con ingredientes convencionales presentes en una composición de pienso animal (dieta) tales como carbonatos de calcio, electrolitos tales como cloruro de amonio, proteínas tales como harina de haba de soja, trigo, almidón, harina de girasol, maíz, harina de carne y huesos, aminoácidos, grasa animal, vitaminas y minerales traza.

Algunos ejemplos particulares de composiciones de la invención son los siguientes:

- 55 - un aditivo de pienso que comprende (a) al menos un compuesto seleccionado entre la Tabla 1 y (b) un antibiótico, (c) al menos una vitamina liposoluble, (d) al menos una vitamina soluble en agua, (e) al menos un mineral traza, y/o (f) al menos un macromineral;
- una composición de pienso animal que comprende un antibiótico y al menos un compuesto seleccionado entre la Tabla 1 y un contenido de proteína cruda de 50 a 800 g/kg de pienso.

60 Las denominadas premezclas son ejemplos de aditivos de pienso animal de la invención. Una premezcla designa una mezcla preferentemente uniforme de uno o más microingredientes con diluyentes y un vehículo. Las premezclas se usan para facilitar la dispersión uniforme de los microingredientes en una mezcla mayor.

65 Además de los ingredientes activos de la invención, la premezcla de la invención comprende al menos una vitamina liposoluble, y/o al menos una vitamina soluble en agua, y/o al menos un mineral traza, y/o al menos un macromineral. En otras palabras, la premezcla de la invención comprende el al menos un compuesto de acuerdo

con la invención junto con al menos un componente adicional seleccionado entre el grupo que consiste en vitaminas liposolubles, vitaminas solubles en agua, minerales traza, y macrominerales.

5 Los macrominerales se pueden añadir separadamente al pienso. Por lo tanto, en una realización particular, la premezcla comprende los ingredientes activos de la invención junto con al menos un componente adicional seleccionado entre el grupo que consiste en vitaminas liposolubles, vitaminas solubles en agua, y minerales traza.

Las siguientes son listas no exclusivas de ejemplos de estos componentes:

- 10 - algunos ejemplos de vitaminas liposolubles son vitamina A, vitamina D3, vitamina E, y vitamina K, por ejemplo vitamina K3.
- Algunos ejemplos de vitaminas solubles en agua son vitamina B12, biotina y colina, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, niacina, ácido fólico y pantotenato, por ejemplo Ca-D-pantotenato.
- 15 - Algunos ejemplos de minerales traza son manganeso, cinc, hierro, cobre, yodo, selenio, y cobalto.
- Algunos ejemplos de macrominerales son calcio, fósforo y sodio.

20 En lo que respecta a composiciones de pienso para rumiantes tales como vacas, así como a los ingredientes de las mismas, la dieta del rumiante está compuesta habitualmente de una fracción fácilmente degradable (denominada concentrado) y una fracción menos fácilmente degradable rica en fibra (denominada heno, forraje, o forraje basto).

25 El heno está compuesto de hierba, legumbres o cereales completos secos. Las hierbas incluyen, entre otras, *Phleum pratense*, Lolium y Festuca. Las legumbres incluyen, entre otras, trébol, lucerna o alfalfa, guisantes, judías y Vicia. Los cereales completos incluyen, entre otros, cebada, maíz, avena, sorgo. Otros cultivos de forraje incluyen caña de azúcar, coles rizadas, colza, y repollos. También se usan para alimentar rumiantes cultivos de raíces tales como nabos, nabos suecos, mangles, remolacha forrajera, y remolacha azucarera (incluyendo pulpa de remolacha azucarera y melazas de remolacha). Otros cultivos más son tubérculos tales como patatas, casava y batata. El forraje ensilado es una versión ensilada de la fracción rica en fibra (por ejemplo, de hierbas, legumbres o cereales completos) mediante la cual se trata el material de alto contenido en agua en un proceso de fermentación anaerobia controlada (fermentado naturalmente o tratado con aditivos).

30 El concentrado está compuesto principalmente de cereales (tales como cebada incluyendo grano de orujo y grano de destilado, maíz, trigo, sorgo), pero también contiene a menudo ingredientes de pienso ricos en proteínas tales como haba de soja, semilla de colza, núcleo de palma, semilla de algodón y girasol.

35 También se puede alimentar a las vacas con raciones mixtas totales (TMR), donde todos los componentes de la dieta, por ejemplo forraje, forraje ensilado y concentrado, se mezclan antes de servirse.

40 Como se ha mencionado anteriormente, una premezcla es un ejemplo de un aditivo de pienso que puede comprender los compuestos activos de acuerdo con la invención. Se entiende que los compuestos se pueden administrar al animal en otras formas diferentes. Por ejemplo, los compuestos también se pueden incluir en un bolo que se podría colocar en el rumen y que podría liberar una cantidad definida de los compuestos de forma continua en dosificaciones bien definidas durante un período específico de tiempo.

45 La presente invención también se refiere a un método para reducir la producción de metano que emana de las actividades digestivas de rumiantes y/o para mejorar el rendimiento del animal rumiante, que comprende administrar por vía oral una cantidad suficiente de una composición de pienso o aditivo de pienso que comprende al menos un antibiótico, y al menos una molécula orgánica sustituida en cualquier posición con al menos un grupo nitrooxi, o una sal de la misma como se define mediante la fórmula (I) con las realizaciones preferentes descritas anteriormente.

50 Además, la invención también se refiere un método como se ha descrito anteriormente, en el que la composición de pienso o el aditivo de pienso de acuerdo con la presente invención se administra al animal junto con al menos una sustancia activa adicional seleccionada entre el grupo que consiste en disulfuro de dialilo, aceite de ajo, isotiocianato de ajo, ácido desoxicólico, ácido quenodesoxicólico y los derivados de los mismos.

55 La invención también se refiere a un método como se ha descrito anteriormente, en el que el animal rumiante se selecciona entre el grupo que consiste en reses, cabras, ovejas, jirafas, bisontes americanos, bisontes europeos, yaks, búfalos de agua, venados, camellos, alpacas, llamas, ñus, antílopes, antílopes americanos y nilgós, y más preferentemente entre el grupo que consiste en: reses, cabras y ovejas.

60 La invención también se refiere a un método como se ha descrito anteriormente, en el que la cantidad de la al menos una molécula orgánica como se define en la fórmula (I) administrada al animal rumiante es de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 g por kg de pienso, preferentemente de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1 g, más preferentemente de 50 mg a 500 mg de compuesto por kg de pienso, y la cantidad de antibiótico administrada al animal rumiante es de 0,5 a 150 mg por kg de pienso, preferentemente de 5 a 50 mg por kg de pienso.

65

La invención también se refiere a un método como se ha descrito anteriormente, en el que la producción de metano en rumiantes calculada en litros por kilogramo de ingesta de materia seca se reduce en al menos un 10 % cuando se mide en cámaras metabólicas. Preferentemente, la reducción de metano es al menos un 15 %, más preferentemente, al menos un 20 %, incluso más preferentemente, al menos un 25 %, lo más preferentemente, al menos un 30 %. También se pueden usar medidas alternativas de la emisión de metano tales como el uso de un haz láser o, para rumiantes lecheros, la correlación de la producción de metano con el perfil de VFA de la leche.

La invención también se refiere a un método como se ha descrito anteriormente, en el que la proporción de conversión de pienso del rumiante se reduce en al menos 1 % cuando se mide en un ensayo de rendimiento convencional. Preferentemente, la proporción de conversión de pienso se reduce en al menos un 2 %, más preferentemente, en al menos un 2,5 %, incluso más preferentemente, en al menos un 3 %, lo más preferentemente, en al menos un 3,5 %.

La invención también se refiere a un método como se ha descrito anteriormente, en el que la proporción en peso de molécula orgánica como se define en la fórmula (I)/antibiótico en la composición de pienso o el aditivo de pienso está comprendida entre 0,05 y 50, preferentemente entre 0,1 y 10, más preferentemente entre 0,5 y 5.

La presente invención se describe adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no se deberían interpretar como limitantes del alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: ensayo in vitro para la producción de metano

Se usó una versión modificada del "Ensayo de valor de Forraje Hohenheim (HFT)" para someter a ensayo el efecto de compuestos específicos en las funciones del rumen imitadas mediante este sistema *in vitro*.

Principio:

Se añade pienso en una jeringa con una composición de licor de rumen y una mezcla apropiada de tampones. La solución se incuba a 39 °C. Después de 8 horas, se mide la cantidad (y composición) de la fase gaseosa producida y se pone en una fórmula para su conversión.

Reactivos:

Solución de elementos masa:

- 6,2 g de dihidrogenofosfato potásico (KH_2PO_4);
- 0,6 g de heptahidrato de sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$);
- 9 ml de ácido fosfórico concentrado (1 mol/l);
- disuelto en agua destilada hasta 1 l (pH de aproximadamente 1,6).

Solución tampón:

- 35,0 g de hidrogenocarbonato sódico (NaHCO_3);
- 4,0 g de hidrogenocarbonato de amonio ($(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$);
- disuelto en agua destilada hasta 1 l.

Solución de elementos traza:

- 13,2 g de dihidrato de cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$);
- 10,0 g de tetrahidrato de cloruro de manganeso(II) ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$);
- 1,0 g de hexahidrato de cloruro de cobalto(II) ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$);
- 8,0 g de cloruro de hierro(III) ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$);
- disuelto en agua destilada hasta 100 ml.

Solución de sal sódica:

- 100 mg de sal sódica;
- disuelto en agua destilada hasta 100 ml.

Solución de reducción:

- se añaden en primer lugar 3 ml de hidróxido sódico ($c = 1 \text{ mol/l}$), y a continuación 427,5 mg de hidrato de sulfuro sódico ($\text{Na}_2\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$) a 71,25 ml de H_2O ;
- la solución se debe preparar poco antes de añadirse a la solución de medio.

Procedimiento:***Pesado de la muestra:***

5 El material del pienso se tamiza hasta 1 mm - habitualmente una TMR (44 % de concentrado, 6 % de heno, 37 % de forraje ensilado de maíz y 13 % de forraje ensilado de hierba) - y se pesa exactamente en 64 jeringas. 4 de estas jeringas son los controles de sustrato, que muestran la producción de gas sin el efecto de los compuestos ensayados. Otras 4 jeringas son el control positivo, en las que se ha añadido sulfonato de bromoetano 0,1 mM. Cuando sea necesario, 4 jeringas contienen un control del vehículo (si los compuestos de ensayo necesitan un vehículo). Las jeringas restantes contienen las sustancias de ensayo, en grupos de 4 jeringas.

Preparación de la solución de medio:

15 Los componentes se mezclan en una botella Woulff en el siguiente orden:

- 711 ml de agua;
- 0,18 ml de solución de elementos traza;
- 355,5 ml de solución tampón;
- 355,5 ml de solución de elementos masa.

20 La solución completa se calienta hasta 39 °C seguido de la adición de 1,83 ml de solución de sal sódica y la adición de la solución de reducción a 36 °C. Se añade el licor de rumen cuando el indicador se vuelve incoloro.

Extracción del licor de rumen:

25 Se añaden 750 ml de licor de rumen a aproximadamente 1.400 ml de solución de medio con agitación continua y gasificación con CO₂.

Llenado de las jeringas, incubación y determinación de los volúmenes de gas y los valores de VFA:

30 Se añade el fluido de rumen diluido (24 ml) a una jeringa de vidrio. Las jeringas se incuban a continuación durante 8 horas a 39 °C con agitación suave. Después de 8 horas, se mide el volumen de gas producido, y se determina el porcentaje de metano en la fase gaseosa mediante cromatografía de gases.

Resultados

35 El alimento fermentado fue una TMR artificial (44 % de concentrado, 6 % de heno, 37 % de forraje ensilado de maíz y 13 % de forraje ensilado de hierba). Se obtuvo monensina en Elanco, y se usó con una concentración de un 0,01 % de materia seca (DM). Se usó 3-nitrooxi-pentanol con dos concentraciones diferentes de un 0,01 % y un 0,005 % de DM.

40 Los resultados se presentan en la siguiente Tabla 2. Se obtuvieron claros efectos aditivos. Sorprendentemente, incluso con la inhibición de metano máxima cuando se usó 3-nitrooxi propanol a un 0,01 % de DM, se observó un efecto aditivo adicional en la proporción de acetato/propionato cuando se combinó con monensina, lo que se traduce en un beneficio de rendimiento adicional para el animal.

45 **Tabla 2:** efecto de la reducción de metano, la producción de ácidos grasos volátiles (VFA) y el perfil de VFA resultante del promedio de tres experimentos con monensina, 3-nitro propanol, o la combinación de ambos. Ace. = acetato; Prop. = propionato; But = butirato.

Composición	Dosis (% DM)	Efecto en la metanogénesis (% comparado con el control)	Efecto en la producción de VFA (% comparado con el control)	Perfil de VFA (como porcentaje de VFA total)		
				Ace.	Prop.	But.
Monensina	0,01	-23 %	-6 %	56	38	6
3-nitrooxi pentanol	0,01	-97 %	-13 %	50	42	8
3-nitrooxi pentanol	0,005	-21 %	-3 %	57	36	7
3-nitrooxi pentanol + Monensina	0,01 + 0,01	-99 %	-15 %	46	47	7
3-nitrooxi pentanol + Monensina	0,005 + 0,01	-48 %	-8 %	52	41	7
Control negativo				60	33	7

50

REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición de pienso o aditivo de pienso que comprende al menos un antibiótico, y al menos una molécula orgánica sustituida en cualquier posición con al menos un grupo nitrooxi, o una sal de la misma como se define mediante la fórmula (I),



en la que Y es una molécula orgánica de la siguiente composición: $\text{C}_a\text{H}_b\text{O}_d\text{N}_e\text{S}_g$,
en la que

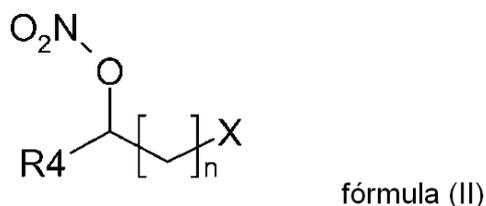
- a está comprendido entre 1 y 25,
- b está comprendido entre 2 y 51,
- d está comprendido entre 0 y 8,
- e está comprendido entre 0 y 5,
- g está comprendido entre 0 y 3,

para reducir la formación de metano que emana de las actividades digestivas de rumiantes, y/o para mejorar el rendimiento del rumiante.

2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que

- a está comprendido entre 1 y 10,
- b está comprendido entre 2 y 21,
- d está comprendido entre 0 y 6,
- e está comprendido entre 0 y 3,
- g está comprendido entre 0 y 1.

3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la molécula orgánica de fórmula (I) es un compuesto de fórmula (II),



en la que

- n está comprendido entre 0 y 12, comprendido preferentemente entre 0 y 6 y, en la que, si $n \neq 0$, la cadena de carbono es una cadena de carbono alifática lineal, cíclica, o ramificada que puede estar sin sustituir o sustituida con hasta 3 grupos hidroxilo, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino o nitrooxi, o una cadena de carbono de alquenilo, o alquinilo mono o poliinsaturada y en cualquier forma isomérica,
- R4 es independientemente, hidrógeno o una cadena lineal, cíclica, o ramificada saturada de un grupo alquilo o alquenilo que contiene de 1 a 12, preferentemente de 1 a 6 átomos de carbono,
- X es hidrógeno, R5, $\text{R5}=\text{N}$, $-\text{OR5}$, $-\text{OCOR5}$, $-\text{NR5R6}$, $-\text{ONO2}$, $-\text{COOR5}$, $-\text{CONR5R6}$, $-\text{NHSO2R5}$ o $-\text{SO2NHR5}$,
- R5 y R6 son independientemente, hidrógeno, cadena de alquilo C1-C12 lineal, ramificada o cíclica, sin sustituir o sustituida con hasta 3 grupos hidroxilo, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino o nitrooxi, cadena de carbono de alquenilo, o alquinilo que puede estar mono o poliinsaturada, y en cualquier forma isomérica.

4. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la molécula orgánica de fórmula (I), o una sal de la misma, se selecciona entre el grupo de compuestos enumerados en la Tabla 1.

5. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el antibiótico se selecciona entre el grupo que consiste en monensina, lasalocid, narasina, maduramicina, semduramicina, salinomicina, avoparcina, actaplanina y penicilina.

6. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la composición de pienso o el aditivo de pienso está combinado además con al menos una sustancia activa adicional seleccionada entre el grupo que consiste en disulfuro de dialilo, aceite de ajo, isotiocianato de alilo, ácido desoxicólico, ácido quenodesoxicólico y los derivados de los mismos.

7. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el animal rumiante se selecciona entre el grupo que consiste en: reses, cabras, ovejas, jirafas, bisontes americanos, bisontes europeos, yaks, búfalos de agua, venados, camellos, alpacas, llamas, ñus, antílopes, antílopes americanos y nilgós.
- 5 8. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la producción de metano en rumiantes calculada en litros por kilogramo de ingesta de materia seca se reduce en al menos un 10 % cuando se mide en cámaras metabólicas.
- 10 9. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la cantidad de la al menos una molécula orgánica como se define en la fórmula (I) administrada al animal rumiante es de 1 mg a 10 g por kg de pienso, y la cantidad de antibiótico administrada al animal rumiante es de 0,5 a 100 mg por kg de pienso.
- 15 10. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la proporción en peso de molécula orgánica como se define en la fórmula (I)/antibiótico está comprendida entre 0,05 y 50.
11. Una composición de pienso o aditivo de pienso que comprende al menos un antibiótico y una molécula orgánica de fórmula (I) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
- 20 12. La composición de la reivindicación 11 que es una premezcla de minerales, una premezcla de vitaminas o una premezcla que incluye vitaminas y minerales, o un bolo.
- 25 13. Método para reducir la producción de metano que emana de las actividades digestivas de rumiantes y/o para mejorar el rendimiento del animal rumiante que comprende administrar al animal por vía oral una cantidad suficiente de una composición de pienso o aditivo de pienso, que comprende al menos un antibiótico, y al menos una molécula orgánica sustituida en cualquier posición con al menos un grupo nitrooxi, o una sal de la misma como se define mediante la fórmula (I),



- 30 en la que Y es una molécula orgánica de la siguiente composición: $\text{C}_a\text{H}_b\text{O}_d\text{N}_e\text{S}_g$, en la que
- 35 a está comprendido entre 1 y 25,
 b está comprendido entre 2 y 51,
 d está comprendido entre 0 y 8,
 e está comprendido entre 0 y 5,
 g está comprendido entre 0 y 3.
- 40 14. Método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la composición de pienso o el aditivo de pienso se administra al animal, junto con al menos una sustancia activa adicional seleccionada entre el grupo que consiste en disulfuro de dialilo, aceite de ajo, isotiocianato de alilo, ácido desoxicólico, ácido quenodesoxicólico y los derivados de los mismos.
- 45 15. Método de acuerdo con las reivindicaciones 13 o 14, en el que el animal rumiante se selecciona entre el grupo que consiste en: reses, cabras, ovejas, jirafas, bisontes americanos, bisontes europeos, yaks, búfalos de agua, venados, camellos, alpacas, llamas, ñus, antílopes, antílopes americanos y nilgós.
- 50 16. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que la cantidad de la al menos una molécula orgánica como se define en la fórmula (I) administrada al animal rumiante es de 1 mg a 10 g por kg de pienso, y la cantidad de antibiótico administrada al animal rumiante es de 0,5 mg a 150 g por kg de pienso.
- 55 17. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en el que la producción de metano en rumiantes calculada en litros por kilogramo de ingesta de materia seca se reduce en al menos un 10 % cuando se mide en cámaras metabólicas.
18. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, en el que la proporción en peso de molécula orgánica como se define en la fórmula (I)/antibiótico está comprendida entre 0,05 y 50.