

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 576 117**

51 Int. Cl.:

A23K 50/00 (2006.01)

A23K 20/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2013** **E 13714000 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016** **EP 2830434**

54 Título: **Uso de paranitroaminoderivados en pienso para reducir la emisión de metano en rumiantes**

30 Prioridad:

26.03.2012 EP 12161270

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

05.07.2016

73 Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)

Het Overloon 1

6411 TE Heerlen, NL

72 Inventor/es:

DUVAL, STEPHANE y

KINDERMANN, MAIK

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 576 117 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 paranitroaminoderivados en pienso para reducir la emisión de metano en rumiantes.

La presente invención se refiere al uso de al menos un compuesto perteneciente a la clase de paranitroaminoderivados para reducir la producción de metano que emana de las actividades digestivas de los rumiantes.

La presente invención también se refiere a un pienso o composiciones de pienso y aditivos para piensos que comprenden los susodichos compuestos. El término pienso o composición de pienso significa cualquier compuesto, preparación, mezcla o composición adecuados para, o destinados a, la ingesta por un animal.

En el presente contexto, un rumiante es un mamífero del orden Artiodactyla que digiere alimento basado en plantas reblandeciéndolo inicialmente dentro del primer estómago del animal, conocido como la panza, regurgitando a continuación la masa semidigerida, ahora conocida como bolo alimenticio, y masticándola de nuevo. El proceso de mascar de nuevo el bolo alimenticio para romper adicionalmente la materia vegetal y estimular la digestión se denomina "rumia".

La fermentación en la panza lleva consigo algunas desventajas. Se produce metano como una consecuencia natural de la fermentación anaeróbica, que representa una pérdida de energía para el animal hospedador. El carbohidrato constituye 70 - 80% de la materia seca en una ración típica de ganado lechero y, a pesar de esto, la absorción de carbohidratos desde el tracto gastrointestinal normalmente está muy limitada. La razón de esto es la fermentación intensiva de carbohidratos en la panza que da como resultado la producción de acetato, propionato y butirato como los principales productos. Estos productos son parte de los llamados ácidos grasos volátiles (VFA, por sus siglas en inglés).

Además de la pérdida de energía, el metano también es un gas con efecto invernadero, que es muchas veces más potente que el CO₂. Su concentración en la atmósfera se ha doblado a lo largo del último siglo y continúa incrementándose alarmantemente. Los rumiantes son los principales causantes de la formación de metano biogénico, y se ha estimado que la prevención de la formación de metano a partir de los rumiantes casi estabilizaría las concentraciones de metano atmosférico.

Por otra parte, la evaluación del protocolo de Kioto seguido por la cumbre del clima de Copenhague en 2009 plantea un incremento de la prioridad en disminuir las emisiones de metano como parte de una estrategia con múltiples gases. Los aditivos más eficaces usados actualmente para reducir la formación de metano contienen antibióticos que disminuyen la proliferación de microorganismos que proporcionan hidrógeno (H₂) a los metanógenos (Sauer y cols. 1998. American Society of Animal Science; 76: 906-914). Sin embargo, el efecto de los antibióticos sobre la formación de metano tiene algunas desventajas debido a la rápida adaptación de la microflora y/o el desarrollo de resistencia que conduce a una pérdida completa del efecto pretendido dentro de un período corto (de 2 a 3 semanas) y debido a que el uso de antibióticos está prohibido en Europa para uso no terapéutico.

Productos no antibióticos (derivados de ácidos biliares) que conducen a la reducción de la emisión de metano, cuando se prueban usando un modelo de estimulación de la panza in vitro, se han publicado recientemente (documento WO 2010072584). Sin embargo, la cantidad requerida para producir una reducción moderada de la emisión de metano no es compatible con las restricciones de los costes en la industria de los piensos para rumiantes.

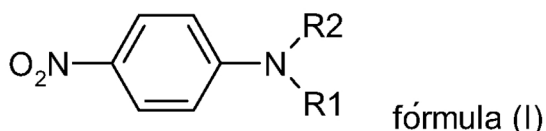
Bajo estas circunstancias, todavía existe una necesidad de desarrollar nuevas sustancias que reduzcan la formación de metano y que estén de acuerdo con la práctica generalmente aceptada y no sean de naturaleza medicinal. Además de reducir la emisión de metano, tales sustancias también pueden contribuir a mejorar el comportamiento de los rumiantes al mejorar la relación de conversión de pienso, reducir la ingesta de pienso, mejorar el aumento de peso y/o mejorar el rendimiento de la canal o la leche.

Los presentes inventores han encontrado ahora sorprendentemente que los compuestos especificados en la presente posteriormente tienen un gran potencial para el uso en piensos a fin de reducir esencialmente la formación de metano sin afectar a la fermentación microbiana de un modo que sea perjudicial para el animal hospedador. Por otra parte, los compuestos de la presente invención pueden tener un gran beneficio en cuanto al comportamiento global del animal según se mide por la relación de conversión del pienso, la ingesta de pienso, el aumento de peso, el rendimiento de la canal o el rendimiento de leche. Dichos compuestos también son más estables que los descritos en la técnica anterior, más seguros 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 la nutrición animal y, por encima de todo, no provocan acumulación de ningún metabolito en la leche o la carne del animal enriquecido y son activos a muy baja concentración en la panza.

En particular, los presentes inventores han observado que el aporte a los rumiantes de al menos un compuesto de paranitroaminoderivado es muy eficaz para reducir la producción de metano que emana de las actividades digestivas de rumiantes sin afectar negativamente a la producción total de VFA.

- 5 Por otra parte, los presentes inventores han mostrado que cuando se reemplaza la función amina, o cuando la posición para del grupo nitro se modifica a meta, se pierde el efecto técnico sobre la producción de metano.

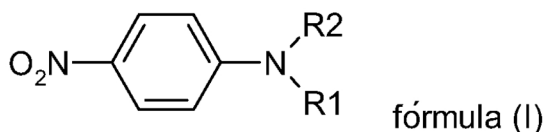
10 Por lo tanto, la presente invención proporciona el uso de al menos un compuesto como el definido por la fórmula (I) o una sal del mismo como un compuesto activo en la alimentación de animales para reducir la formación de metano que emana de las actividades digestivas de los rumiantes.



15 en donde R^1 y R^2 independientemente uno de otro representan H, $-CH_3$ o $-CH_2R^3$, y en donde R^3 es un grupo hidrocarbonado C_1-C_8 saturado o insaturado, lineal, ramificado o cíclico, opcionalmente sustituido con de 1 a 3 grupos seleccionados de $-OH$, $-NH_2$, $-COOH$, y en donde uno o dos de los átomos de carbono en el hidrocarburo C_1-C_8 está opcionalmente sustituido con un átomo de nitrógeno u oxígeno.

20 La invención proporciona además un método para reducir la producción de metano que emana de las actividades digestivas de los rumiantes que comprende administrar oralmente al animal una cantidad suficiente de al menos un paranitroaminoderivado o una sal del mismo según se define por la fórmula (I). Por administración oral se entiende una simple comida o la administración manual de un bolo.

En todas las realizaciones de la presente invención, el compuesto de fórmula (I) o las sales del mismo se definen mediante el siguiente compuesto de fórmula (I)



25 en donde R^1 y R^2 independientemente uno de otro representan H, $-CH_3$ o $-CH_2R^3$, y en donde R^3 es un grupo hidrocarbonado C_1-C_8 saturado o insaturado, lineal, ramificado o cíclico, opcionalmente sustituido con de 1 a 3 grupos seleccionados de $-OH$, $-NH_2$, $-COOH$, y en donde uno o dos de los átomos de carbono en el hidrocarburo C_1-C_8 está opcionalmente sustituido con un átomo de nitrógeno u oxígeno.

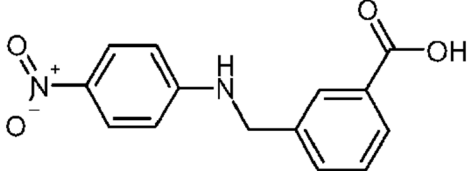
30 En otra realización, compuestos preferidos de fórmula (I) según la presente invención son compuestos en los que R^1 es H o $-CH_3$. Compuestos más preferidos de fórmula (I) son compuestos en los que R^1 es H o $-CH_3$, R^2 es H, $-CH_3$ o $-CH_2R^3$, y R^3 es un grupo hidrocarbonado C_1-C_4 saturado o insaturado, lineal o ramificado. Compuestos aún más preferidos de fórmula (I) son compuestos en los que R^1 es H o $-CH_3$, R^2 es H, $-CH_3$ o $-CH_2R^3$, y R^3 es un grupo hidrocarbonado C_1-C_3 saturado lineal o ramificado.

35 Los compuestos más preferidos según la presente invención se seleccionan del grupo de compuestos que comprende (4-nitro-fenil)-amina, metil-(4-nitro-fenil)-amina, etil-(4-nitro-fenil)-amina, dimetil-(4-nitro-fenil)-amina, (4-nitro-fenil)-propil-amina, isopropil-(4-nitro-fenil)-amina, 2-(4-nitro-fenilamino)-etanol, 3-(4-nitro-fenilamino)-propan-1-ol, 4-nitro-N-(piridin-2-ilmetil)anilina, ácido 4-((4-nitro-fenilamino)-metil)-benzoico y ácido 3-((4-nitro-fenilamino)-metil)-benzoico que se listan y se representan en la tabla 1.

40

Tabla 1: Compuestos preferidos de fórmula (I) según la presente invención

Identificador del compuesto	del	Estructura del compuesto	Nombre del compuesto
1			(4-Nitro-fenil)-amina
2			Metil-(4-nitro-fenil)-amina
3			Etil-(4-nitro-fenil)-amina
4			Dimetil-(4-nitro-fenil)-amina
5			(4-Nitro-fenil)-propilamina
6			Isopropil-(4-nitro-fenil)-amina
7			2-(4-Nitro-fenilamino)-etanol
8			3-(4-Nitro-fenilamino)-propan-1-ol
9			4-Nitro-N-(piridin-2-ilmetil)anilina
10			Ácido 4-((4-nitro-fenilamino)-metil)-benzoico

Identificador del compuesto	del	Estructura del compuesto	Nombre del compuesto
11			Ácido 3-((4-Nitro-fenilamino)-metil)-benzoico

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

5 Los compuestos de la presente invención también comprenden sales del compuesto de fórmula (I). Cationes preferidos para la preparación de sales se pueden seleccionar del grupo que consiste en sodio (Na^+), potasio (K^+), litio (Li^+), magnesio (Mg^{2+}), calcio (Ca^{2+}), bario (Ba^{2+}), estroncio (Sr^{2+}) y amonio (NH_4^+). Las sales también se pueden preparar a partir de un metal alcalino o un metal alcalinotérreo.

10 Los compuestos de la presente invención se pueden fabricar en principio según métodos sintéticos conocidos de por sí en la técnica y/o basados en métodos como los descritos en los ejemplos.

En estos casos, métodos apropiados para purificar el producto (compuestos de fórmula (I)) pueden ser elegidos por los expertos en la técnica, es decir mediante cromatografía en columna, o el compuesto de fórmula (I) se puede aislar y purificar mediante métodos conocidos de por sí.

15 La emisión de metano por los rumiantes se puede medir fácilmente en animales individuales en cámaras metabólicas mediante métodos conocidos en la técnica (Grainger y cols., 2007 J. Dairy Science; 90: 2755-2766). Por otra parte, también se puede determinar en el establo mediante una tecnología emergente usando rayos láser (McGinn y cols., 2009, Journal of Environmental Quality; 38: 1796-1802). Alternativamente, el metano producido por un rumiante lechero también se puede determinar mediante la medida de los perfiles de VFA en la leche según el documento WO 2009/156453.

25 El comportamiento de los rumiantes se puede determinar mediante métodos muy conocidos en la técnica, y habitualmente se caracteriza por la relación de conversión de pienso, la ingesta de pienso, el aumento de peso, el rendimiento de la canal o el rendimiento de leche.

30 La presente invención también se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo según la presente invención en combinación con al menos una sustancia activa adicional que muestra efectos similares con respecto a la formación de metano en la panza y que se selecciona del grupo que consiste en disulfuro de dialilo, aceite gálico, isotiocianato de alilo, ácido desoxicólico, ácido quenodesoxicólico y derivados de los mismos.

Componentes adicionales que se podrían aportar junto con el compuesto según la presente invención son, por ejemplo, levaduras, aceites esenciales e ionoforas como monensina, rumensina.

35 Se contempla actualmente que el disulfuro de dialilo, el aceite gálico, el isotiocianato de alilo, el ácido desoxicólico, el ácido quenodesoxicólico y los derivados de los mismos se administran independientemente en intervalos de dosificación de, por ejemplo, 0,01-500 mg de sustancia activa por kg de pienso (ppm). Estos compuestos bien están disponibles comercialmente o bien pueden ser preparados por un experto usando procedimientos y métodos muy conocidos en la técnica anterior.

Mamíferos rumiantes según la presente invención incluyen ganado vacuno, ovejas, cabras, jirafas, bisonte americano, bisonte europeo, yaks, búfalo de agua, ciervos, camellos, alpacas, llamas, ñu, antílope, berrendo y nilgó.

45 Para todas las realizaciones de la presente invención, las especies preferidas son ganado vacuno, cabras, ovejas, bisonte americano, bisonte europeo, yaks y búfalo de agua. Especies más preferidas son el ganado bovino doméstico, las ovejas y las cabras, las especies más preferidas son el ganado bovino doméstico. El término incluye todas las razas de ganado bovino doméstico, y todos los tipos de producción de ganado bovino, en particular vacas lecheras y terneros.

50 La presente invención también se refiere al uso de al menos un compuesto de fórmula (I), o una sal del mismo, según la presente invención, en donde la producción de metano en rumiantes calculada en litros por kilogramo de materia seca se reduce en al menos 10% cuando se mide en cámaras metabólicas. Preferiblemente, la reducción de metano es al menos 15%, más preferiblemente al menos 20%, aún más preferiblemente, al menos 25%, lo más

preferiblemente, al menos 30%. También se pueden usar medidas de emisión de metano alternativas como usar un rayo láser o, para rumiantes lecheros, correlacionar la producción de metano con el perfil de VFA en la leche.

5 La presente invención también se refiere al uso de al menos un compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo según la presente invención, en donde la relación de conversión de pienso para rumiantes se reduce en al menos 1% cuando se mide en un estudio de comportamiento convencional. Preferiblemente, la relación de conversión de pienso se reduce en al menos 2%, más preferiblemente en al menos 2,5%, aún más preferiblemente en al menos 3%, lo más preferiblemente en al menos 3,5%.

10 La presente invención también se refiere al uso de al menos un compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo según la presente invención, en donde la cantidad de compuesto de fórmula (I) administrada al animal rumiante es de 1 mg a 10 g por kg de pienso, preferiblemente de 10 mg a 1 g por kg de pienso, más preferiblemente de 50 mg a 500 mg por kg de pienso. Para el uso en un pienso, sin embargo, los compuestos de fórmula (I) o las sales de los mismos no necesitan ser tan puros; por ejemplo, puede incluir otros compuestos y derivados.

15 Como se indica anteriormente, los compuestos de la presente invención son útiles como compuestos para aditivos de piensos y composiciones de pienso para rumiantes, y según esto son útiles como los ingredientes activos en tal pienso para reducir la formación de metano en el tracto digestivo del animal.

20 Para conseguir su uso como tales ingredientes para el pienso de rumiantes, los compuestos se pueden incorporar en el pienso mediante métodos conocidos de por sí en la técnica de la formulación y el procesamiento de piensos.

25 Por lo tanto, aspectos adicionales de la presente invención son formulaciones, es decir aditivos para piensos y composiciones de pienso que contienen compuestos como los definidos anteriormente en la presente. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a una composición de pienso o un aditivo para piensos que comprende al menos un compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo. En una realización preferida, la composición es una premezcla de minerales, una premezcla de vitaminas que incluye vitaminas y minerales o un bolo.

30 La dosificación diaria normal de un compuesto según la invención proporcionada a un animal por la ingesta de pienso depende del tipo de animal y su estado. Normalmente, esta dosificación debe estar en el intervalo de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 g, preferiblemente de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1 g, más preferiblemente de 50 mg a 500 mg de compuesto por kg de pienso.

35 El compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo se puede usar en combinación con ingredientes convencionales presentes en una composición de pienso (dieta) tales como carbonatos cálcicos, electrolitos tales como cloruro amónico, proteínas tales como harina de soja, trigo, almidón, harina de girasol, maíz, harina de carne y huesos, aminoácidos, grasa animal, vitaminas y oligominerales.

Ejemplos particulares de composiciones de la invención son los siguientes:

- 40
- Un aditivo para piensos que comprende (a) al menos un compuesto seleccionado de la tabla 1 y (b) al menos una vitamina liposoluble, (c) al menos una vitamina hidrosoluble, (d) al menos un oligomineral y/o (e) al menos un macromineral;
 - Una composición de pienso que comprende al menos un compuesto seleccionado de la tabla 1 y un contenido de proteína en bruto de 50 a 800 g/kg de pienso.

45 Las llamadas premezclas son ejemplos de aditivos para piensos de la invención. Una premezcla indica una mezcla preferiblemente uniforme de uno o más microingredientes con diluyentes y/o vehículo. Las premezclas se usan para facilitar la dispersión uniforme de los microingredientes en una mezcla mayor.

50 Aparte de los ingredientes activos de la invención, la premezcla de la invención contiene al menos una vitamina liposoluble y/o al menos una vitamina hidrosoluble y/o al menos un oligomineral y/o al menos un macromineral. En otras palabras, la premezcla de la invención comprende el al menos un compuesto según la invención junto con al menos un componente adicional seleccionado del grupo que consiste en vitaminas liposolubles, vitaminas hidrosolubles, oligominerales y macrominerales.

55 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 del grupo que consiste en vitaminas liposolubles, vitaminas hidrosolubles y oligominerales.

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

- 60
- Ejemplos de vitaminas liposolubles son vitamina A, vitamina D3, vitamina E y vitamina K, p. ej. vitamina K3.

- Ejemplos de vitaminas hidrosolubles son vitamina B12, biotina y colina, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, niacina, ácido fólico y pantotenato, p. ej. D-pantotenato Ca.
- Ejemplos de oligominerales son manganeso, cinc, hierro, cobre, yodo, selenio y cobalto.
- Ejemplos de macrominerales son calcio, fósforo y sodio.

5 En cuanto a composiciones de pienso para rumiantes tales como vacas, así como ingredientes de los mismos, la dieta del rumiante está compuesta habitualmente por una fracción fácilmente degradable (llamada concentrado) y una fracción menos fácilmente degradable rica en fibra (llamada heno, forraje o pasto).

10 El heno está hecho de gramínea secada, legumbres o cereales integrales. Las gramíneas incluyen entre otras fleo, ballicos, festucas. Las legumbres incluyen entre otras trébol, mielga o alfalfa, guisantes, habas y vezas. Los cereales integrales incluyen entre otros cebada, maíz, avena, sorgo. Otros cultivos forrajeros incluyen caña de azúcar, coles rizadas, colzas y berzas. También se usan para alimentar a los rumiantes cultivos de raíz tales como nabos, colinabos, acelgas blancas, remolacha forrajera y remolacha azucarera (incluyendo pulpa de remolacha azucarera y melazas de remolacha). Otros cultivos adicionales son tubérculos tales como patatas, yuca y batata. El ensilaje es una versión ensilada de la fracción rica en fibras (p. ej. de gramíneas, legumbres o cereales integrales) en donde material con un alto contenido de agua se trata con un procedimiento de fermentación anaeróbica controlada (naturalmente fermentado o tratado con aditivos).

20 El concentrado está constituido principalmente por cereales (tales como cebada incluyendo grano cervecero y grano de destilería, maíz, trigo, sorgo), pero también contiene a menudo ingredientes del pienso ricos en proteínas tales como soja, colza, almendra de palma, semillas de algodón y girasol. Las vacas también se pueden alimentar con raciones mixtas totales (TMR, por sus siglas en inglés), donde todos los componentes de la dieta, p. ej. forraje, ensilaje y concentrado, se mezclan antes de servir.

25 Como se menciona anteriormente, una premezcla es un ejemplo de un aditivo para piensos que puede comprender los compuestos activos según 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 situará en la panza y que liberará una cantidad definida de los compuestos activos continuamente en dosificaciones bien definidas a lo largo de un período específico.

30 La presente invención se refiere además a un método para reducir la producción de metano que emana de las actividades digestivas de los rumiantes que comprende administrar oralmente una cantidad suficiente de al menos un compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo con las realizaciones preferidas descritas anteriormente.

35 Por otra parte, la invención se refiere además a un método como el descrito anteriormente, en el que el compuesto de fórmula (I) se administra al animal en combinación con al menos una sustancia activa adicional seleccionada del grupo que consiste en disulfuro de dialilo, aceite gálico, isotiocianato de alilo, ácido desoxicólico, ácido quenodesoxicólico y derivados de los mismos.

40 La invención también se refiere a un método como el descrito anteriormente, en el que el animal rumiante se selecciona del grupo que consiste en: ganado vacuno, cabras, ovejas, jirafas, bisonte americano, bisonte europeo, yaks, búfalo de agua, ciervo, camellos, alpacas, llamas, ñu, antílope, berrendo y nilgó, y más preferiblemente del grupo que consiste en: ganado vacuno, cabras y ovejas.

45 La invención también se refiere a un método como el descrito anteriormente, en el que la cantidad del al menos un compuesto activo que se define en la fórmula (I) administrado al animal rumiante es de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 g por kg de pienso, preferiblemente de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1 g, más preferiblemente de 50 mg a 500 mg de compuesto por kg de pienso.

50 La invención también se refiere a un método como el 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 10% cuando se mide en cámaras metabólicas. Preferiblemente, la reducción de metano es al menos 15%, más preferiblemente, al menos 20%, aún más preferiblemente, al menos 25%, lo más preferiblemente, al menos 30%. También se pueden usar medidas de emisión de metano alternativas como usar un rayo láser o, para rumiantes lecheros, correlacionar la producción de metano con el perfil de VFA en la leche.

55 La invención también se refiere a un método como el descrito anteriormente, en el que la relación de conversión de pienso para rumiantes se reduce en al menos 1% cuando se mide en un estudio de comportamiento convencional. Preferiblemente, la relación de conversión de pienso se reduce en al menos 2%, más preferiblemente, en al menos 2,5%, aún más preferiblemente, en al menos 3%, lo más preferiblemente, en al menos 3,5%.

La presente invención se describe adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no se debe considerar que limiten el alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Prueba in vitro para la producción de metano

- 5 Se usó una versión modificada de la "Prueba del índice del forraje de Hohenheim (HFT, por sus siglas en inglés)" para probar el efecto de compuestos específicos sobre las funciones de la panza imitadas por este sistema in vitro.

Principio:

- 10 El pienso se aporta en una jeringa con una composición de licor de la panza y una mezcla apropiada de tampones. La solución se incuba a 39°C. Después de 8 horas, la cantidad (y la composición) de metano producido se mide y se introduce en una fórmula para la conversión.

Reactivos:

Solución de macroelementos:

- 6,2 g de dihidrogenofosfato potásico (KH_2PO_4)
- 0,6 g de heptahidrato de sulfato magnésico ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- 15 – 9 ml de ácido fosfórico concentrado (1 mol/l)
- disueltos en agua destilada hasta 1 l (pH aproximadamente 1,6)

Solución tamponadora:

- 35,0 g de hidrogenocarbonato sódico (NaHCO_3)
- 20 – 4,0 g de hidrogenocarbonato amónico ($(\text{NH}_4)\text{HCO}_3$)
- disueltos en agua destilada hasta 1 l

Solución de oligoelementos:

- 13,2 g de dihidrato de cloruro cálcico ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- 10,0 g de tetrahidrato de cloruro de manganeso(II) ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
- 25 – 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) ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- disueltos en agua destilada hasta 100 ml

Solución de sal sódica:

- 100 mg de sal sódica
- 30 – disueltos en agua destilada hasta 100 ml

Solución de reducción:

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

5 Procedimiento:

Pesada de muestras:

- El material para pienso se tamiza hasta 1 mm - habitualmente TMR (44% de concentrado, 6% de heno, 37% de ensilaje de maíz y 13% de ensilaje de gramíneas) - y se pesa exactamente en 64 jeringas. 4 de estas jeringas son los controles de sustrato, que presentan la producción de gas sin el efecto de los compuestos probados. Otras 4 jeringas son controles positivos, en los que se ha añadido sulfonato de bromoetano hasta 0,1 mM. Cuando se necesite, 4 jeringas contienen un control de vehículo (si los compuestos de prueba necesitan un vehículo). Las jeringas restantes contienen las sustancias de prueba, en grupos de 4 jeringas.

Preparación de la solución de medio:

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

- 15
- 711 ml de agua
 - 0,18 ml de solución de oligoelementos
 - 355,5 ml de solución tamponadora
 - 355,5 ml de solución de macroelementos

- 20
- La solución terminada se calienta hasta 39°C seguido por la adición de 1,83 ml de solución de sal sódica y la adición de la solución de reducción a 36 °C. El licor de la panza se añade, cuando el indicador se vuelve incoloro.

Extracción del licor de la panza:

Se añaden 750 ml de licor de la panza a aproximadamente 1.400 ml de solución de medio bajo agitación y gasificación con CO_2 continuadas.

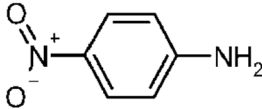
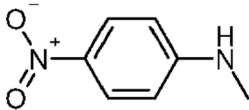
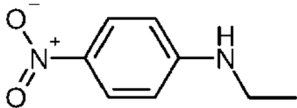
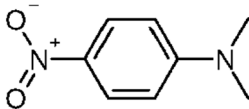
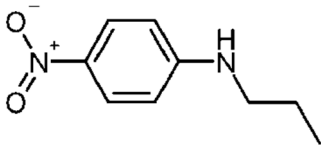
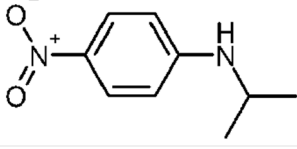
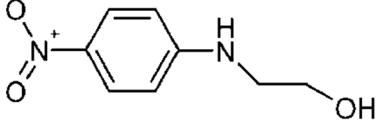
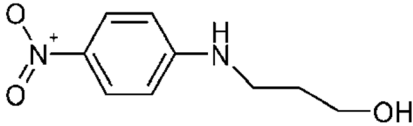
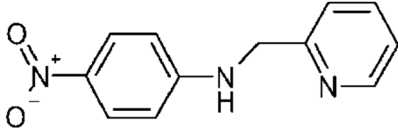
Carga de las jeringas, incubación y determinación de los volúmenes de gas y los índices de VFA:

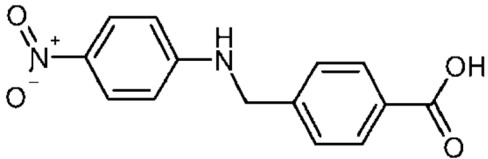
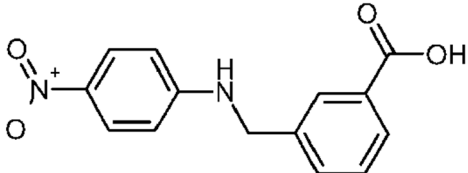
- 25
- El fluido de la panza diluido (24 ml) se añade a la jeringa de vidrio. A continuación, las jeringas se incuban durante 8 horas a 39°C bajo agitación suave. Después de 8 horas, se mide el volumen de gas producido y se determina el porcentaje de metano en la fase gaseosa mediante cromatografía de gases.

Resultados

- 30
- El alimento fermentado era TMR artificial (44% de concentrado, 6% de heno, 37% de ensilaje de maíz y 13% de ensilaje de gramíneas). Los compuestos producidos que se describen en los ejemplos 3 a 11 se añadieron a las jeringas de fermentación hasta una concentración de 1 a 0,1% de materia seca (DM, por sus siglas en inglés). Los resultados del efecto in vitro se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 2: Efecto de reducción de metano resultante del promedio de dos experimentos con algunos compuestos según la presente invención (un cambio de un número entero en la columna efecto sobre la metanogénesis (%) significa una reducción en el metano producido en comparación con el control; sin valor significa que la concentración no se probaba)

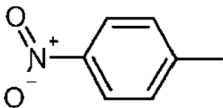
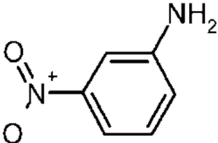
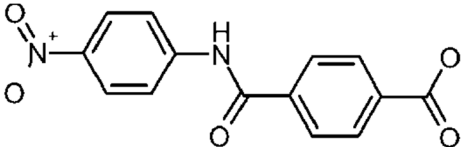
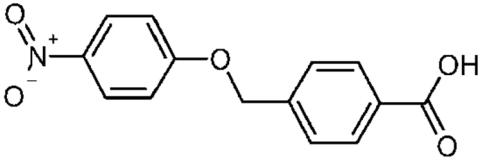
Estructura	efecto sobre la metanogénesis (%)			
	1% DM	0,5% DM	0,25% DM	0,1% DM
	100	88	43	15
	96			3
	97			0
	94			0
	100	60	20	5
	99			2
	100			6
	100			1
	95			3
	97	21	3	

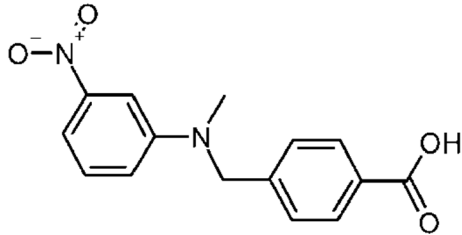
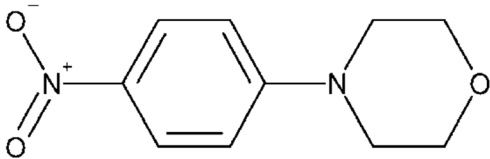
Estructura	efecto sobre la metanogénesis (%)			
	1% DM	0,5% DM	0,25% DM	0,1% DM
				
	88			1

Ejemplo 2: Ejemplo comparativo: prueba in vitro para la producción de metano.

Se ha realizado el mismo ensayo in vitro que se describe en el Ejemplo 1 con una serie de moléculas, en donde bien el grupo amina se ha reemplazado o bien el grupo amina no está en posición para. Estos datos demuestran que solo se observa una actividad de reducción de metano significativa cuando está presente un grupo amina y cuando está en la posición para (compárese la tabla 2 con la tabla 3).

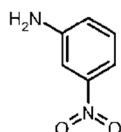
Tabla 3: Efecto de reducción de metano resultante del promedio de dos experimentos con los compuestos mencionados posteriormente en los que el grupo amina se ha intercambiado, o en los que la posición del grupo amina se ha intercambiado. (Un cambio de un número entero en la columna efecto sobre la metanogénesis (%) significa una reducción en el metano producido en comparación con el control; sin valor significa que la concentración no se probaba)

Identificación	Estructura	efecto sobre la metanogénesis (%)	
		1% DM	0,1% DM
A		8	
B		7	
C		3	
D		6	
E		19	

Identificación	Estructura	efecto sobre la metanogénesis (%)	
		1% DM	0,1% DM
			
F		8	

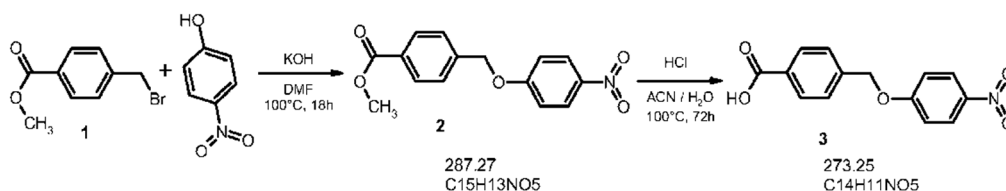
Para este ejemplo comparativo, los compuestos de la tabla 3 se adquirieron de proveedores de productos químicos o se produjeron según los siguientes procedimientos:

5 Compuesto B: 3-Nitro-fenilamina



La 3-nitro-fenilamina se adquirió de Lancaster. CAS [99-09-2]. N° de catálogo 4063. N° de Lote 00008411 1H. RMN (300 MHz, DMSO-d6): δ 5,79 (s ancho, 2H), 6,89-6,96 (m, 1H), 7,19-7,31 (m, 2H), 7,35 (t, J=2,0 Hz, 1H). MS: 139,0 [C6H6N2O2+H]⁺.

10 Compuesto D: Síntesis de ácido 4-(4-nitro-fenoximetil)-benzoico



Éster metílico de ácido 4-(4-nitro-fenoximetil)-benzoico **2**:

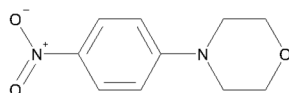
- 15 Se añadieron 4-nitrofenol (2,53 g, 1,2 eq) y 4-(bromometil)benzoato de metilo **1** (3,48 g, 1,0 eq) a una suspensión de hidróxido potásico (1,70 g, 2,0 eq) en dimetilformamida anhidra (100 ml). La mezcla de reacción se agitó a 100°C durante 18 horas. Después de la adición de agua (200 ml), la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 100 ml), se secó sobre sulfato magnésico y los disolventes se evaporaron bajo vacío. La suspensión residual (en dimetilformamida) se separó por filtración y los disolventes residuales se evaporaron a vacío para proporcionar el
- 20 compuesto **2** como un polvo amarillento; rendimiento 2,98 g (10,37 mmol, 68%).

Ácido 4-(4-nitro-fenoximetil)-benzoico **3**:

- 25 Se añadió una solución (3N) de ácido clorhídrico (200 ml) a una solución del compuesto **2** (2,98 g, 1,0 eq) en acetonitrilo (200 ml). La mezcla de reacción se agitó a 100°C durante 72 horas. El precipitado resultante se separó por filtración para proporcionar el compuesto **3** como un polvo blanco; rendimiento 1,33 g (4,87 mmol, 47%).

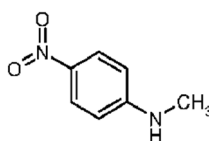
¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ 5,35 (s, 2H), 7,22 (d, J=9,3 Hz, 2H), 7,56 (d, J=8,4 Hz, 2H), 7,96 (d, J=8,4 Hz, 2H), 8,21 (d, J=9,3 Hz, 2H), 12,97 (s ancho, 1 H). MS: 274,1 [C₁₄H₁₁NO₅+H]⁺.

Compuesto F: 4-(4-Nitrofenil)morfolina



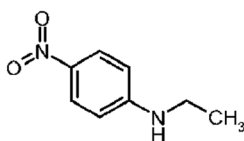
- 5 La 4-(4-nitrofenil)morfolina se adquirió de ABCR. CAS [10389-51-2]. N° de Catálogo AV24933/AB146794. Lote N° 1196165.

Ejemplo 3: Síntesis de metil-(4-nitro-fenil)-amina



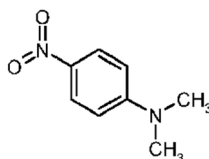
- 10 La metil-(4-nitro-fenil)-amina se adquirió de Alfa Aesar. CAS [100-15-2]. N° de Catálogo A15548. Lote N° A6950A. ¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ 2,77 (d, J=5,0 Hz, 3H), 6,58 (d, J=9,3 Hz, 2H), 7,27 (s ancho, 1 H), 7,98 (d, J=9,3 Hz, 2H). MS: 153,0 [C₇H₈N₂O₂+H]⁺.

Ejemplo 4: Síntesis de etil-(4-nitro-fenil)-amina



- 15 La etil-(4-nitro-fenil)-amina se adquirió de Sigma-Aldrich. CAS [3665-80-3]. N° de Catálogo 328499. Lote N° 1061MC. ¹H RMN (300 MHz, CHCl₃-d): δ 1,16 (t, J=7,2 Hz, 3H), 3,07-3,22 (m, 2H), 6,60 (d, J=9,3 Hz, 2H), 7,15-7,25 (m, 1H), 7,97 (d, J=9,3 Hz, 2H). MS: 167,0 [C₈H₁₀N₂O₂+H]⁺.

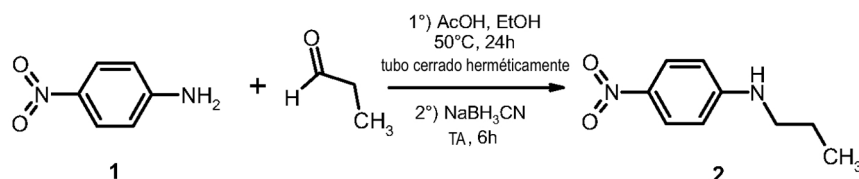
Ejemplo 5: Síntesis de Dimetil-(4-nitro-fenil)-amina



- 20 La dimetil-(4-nitro-fenil)-amina se adquirió de Alfa Aesar. CAS [100-23-2]. N° de Catálogo L0040G. Lote N° 10107319. ¹H RMN (300 MHz, CHCl₃-d): δ 3,07 (s, 6H), 6,75 (d, J=9,5 Hz, 2H), 8,03 (d, J=9,5 Hz, 2H). MS: 167,0 [C₈H₁₀N₂O₂+H]⁺.

25

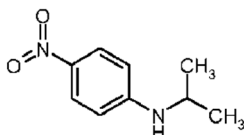
Ejemplo 6: Síntesis de (4-nitro-fenil)-propil-amina



Se añadieron propionaldehído (1,90 g, 1,2 eq) y ácido acético glacial (2,48 ml, 2,0 eq) a una solución de 4-nitroanilina **1** (3,00 g, 1,0 eq) en 70 ml de etanol absoluto. La mezcla de reacción se calentó a 70°C durante 24 horas en un tubo cerrado herméticamente. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, se añadió en porciones cianoborohidruro sódico (2,18 g, 1,6 eq) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. Después de la adición de agua (50 ml), la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3x100 ml), se secó sobre sulfato sódico y los disolventes se evaporaron bajo vacío. El residuo se adsorbió sobre gel de sílice y se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido (ciclohexano/acetato de etilo 100/0 a 100/0 seguido por ciclohexano/acetato de etilo de 100/0 a 80/20) proporcionando 0,87 g del compuesto **2** como un polvo amarillo; rendimiento 0,78 g (4.33 mmol, 22%).

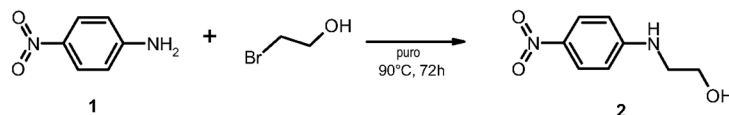
¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ 0,89 (t, J=7,3 Hz, 3H), 1,56 (sext, J=7,3 Hz, 2H), 3,02-3,15 (m, 2H), 6,61 (d, J=9,3 Hz, 2H), 7,20-7,32 (m, 1 H), 7,96 (d, J=9,3 Hz, 2H). MS: 181,0 [C₉H₁₂N₂O₂+H]⁺.

Ejemplo 7: Síntesis de isopropil-(4-nitro-fenil)-amina



La isopropil-(4-nitro-fenil)-amina se adquirió de Alfa Aesar. CAS [25186-43-0]. N° de Catálogo H52375. Lote N° A05X026. ¹H RMN (300 MHz, CHCl₃-d): δ 1,15 (d, J=6,4 Hz, 6H), 3,58-3,77 (m, 1 H), 6,60 (d, J=9,3 Hz, 2H), 7,13 (d, J=7,5 Hz 1 H), 7,96 (d, J=9,3 Hz, 2H). MS: 191,0 [C₉H₁₂N₂O₂+H]⁺.

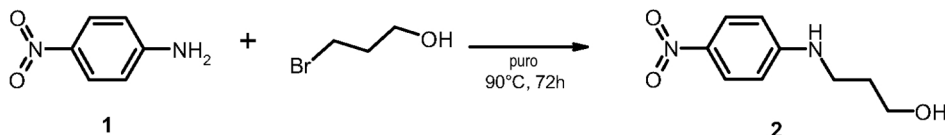
Ejemplo 8: Síntesis de 2-(4-nitro-fenilamino)-etanol



La 4-nitroanilina **1** (2,00 g, 1,0 eq) se mezcló en 2-bromoetanol (0,71 ml, 0,7 eq) en un tubo cerrado herméticamente. La mezcla de reacción se agitó a 90°C durante 72 horas. Después de la dilución con acetato de etilo (50 ml) y solución de hidróxido sódico (1 N) (50 ml), la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3 x 100 ml), se lavó con solución de hidróxido sódico (1N) (2 x 50 ml), se lavó con agua (50 ml), se secó sobre sulfato sódico y los disolventes se evaporaron bajo vacío. El residuo se adsorbió sobre gel de sílice y se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido (ciclohexano/acetato de etilo de 100/0 a 100/0 seguido por ciclohexano/acetato de etilo de 100/0 a 30/70) proporcionando el compuesto **2** como un polvo amarillo; rendimiento 1,13 g (6,2 mmol, 61%).

¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ 3,15-3,27 (m, 2H), 3,49-3,60 (m, 2H), 4,78 (t, J=5,3 Hz, 1 H), 6,64 (d, J=9,3 Hz, 2H), 7,20-7,35 (m, 1 H), 7,96 (d, J=9,3 Hz, 2H). MS: 183,0 [C₈H₁₀N₂O₃+H]⁺.

Ejemplo 9: Síntesis de 3-(4-nitro-fenilamino)-propan-1-ol

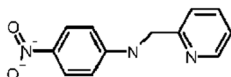


La 4-nitroanilina **1** (5,00 g, 1,0 eq) se mezcló en 3-bromopropanol (2,61 ml, 0,7 eq) en un tubo cerrado herméticamente. La mezcla de reacción se agitó a 90°C durante 18 horas. Después de la dilución con acetato de

etilo (50 ml) y solución de hidróxido sódico (1 N) (50 ml), la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3x100 ml), se lavó con agua (50 ml), se secó sobre sulfato sódico y los disolventes se evaporaron bajo vacío. El residuo se adsorbió sobre gel de sílice y se purificó mediante cromatografía de desarrollo rápido (ciclohexano/acetato de etilo de 100/0 a 100/0 seguido por ciclohexano/acetato de etilo de 100/0 a 30/70) proporcionando el compuesto **2** como un polvo

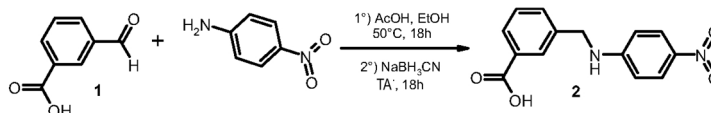
amarillo; rendimiento 3,29 g (16,76 mmol, 58%).
¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ 1,69 (quint, J=6,3 Hz, 2H), 3,12-3,24 (m, 2H), 3,41-3,53 (m, 2H), 4,51 (t, J=5,1 Hz, 1 H), 6,61 (d, J=9,3 Hz, 2H), 7,24 (t, J=5,2 Hz, 1 H), 7,96 (d, J=9,3 Hz, 2H). MS: 197,0 [C₉H₁₂N₂O₃+H]⁺.

Ejemplo 10: Síntesis de 4-nitro-N-(Piridin-2-ilmetil)anilina



La 4-nitro-N-(Piridin-2-ilmetil)anilina se adquirió de AURORA FINE CHEMICALS. CAS [408365-67-3]. N° de Catálogo A00.198.769. Lote N° 1108894.

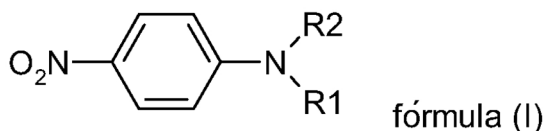
Ejemplo 11: Síntesis de ácido 3-((4-nitro-fenilamino)-metil)-benzoico



Se añadieron 4-nitroanilina (2,00 g, 1,0 eq) y ácido acético glacial (1,66 ml, 2,0 eq) a una solución de 3-carboxibenzaldehído **1** (2,17 g, 1,0 eq) en 100 ml de etanol (seco). La mezcla de reacción se lavó a 50°C durante 18 horas. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, se añadió en porciones cianoborohidruro sódico (1,46 g, 1,6 eq) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. Después de la evaporación del disolvente bajo vacío, el residuo se trituroó en agua (100 ml), se separó por filtración y se lavó con una mezcla de diclorometano/metanol (95/5) (10 ml) para proporcionar el compuesto **2** como un sólido amarillo; Rendimiento 2,18 g (8,0 mmol, 55%).
¹H RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ 4,48 (d, J=6,1 Hz, 2H), 6,66 (d, J=9,3 Hz, 2H), 7,46 (t, J=7,7 Hz, 1 H), 7,58 (d, J=7,7 Hz, 1 H), 7,77-8,00 (m, 5H), 12,95 (s, 1 H).
 MS: 273,1 [C₁₄H₁₂N₂O₄+H]⁺.

REIVINDICACIONES

1. Uso de al menos un compuesto como el definido por la fórmula (I) o una sal del mismo como un compuesto activo en la alimentación de animales para reducir la formación de metano que emana de las actividades digestivas de los rumiantes.



en donde R^1 y R^2 independientemente uno de otro representan H, $-CH_3$ o $-CH_2R^3$, y en donde R^3 es un grupo hidrocarbonado C_1-C_8 saturado o insaturado, lineal, ramificado o cíclico, opcionalmente sustituido con de 1 a 3 grupos seleccionados de $-OH$, $-NH_2$, $-COOH$, y en donde uno o dos de los átomos de carbono en el hidrocarburo C_1-C_8 está opcionalmente sustituido con un átomo de nitrógeno u oxígeno.

2. Uso según la reivindicación 1, en el que R^1 es H o $-CH_3$.

3. Uso según la reivindicación 1 o 2, en el que R^1 es H o $-CH_3$, R^2 es H, $-CH_3$ o $-CH_2R^3$, y R^3 es un grupo hidrocarbonado C_1-C_3 saturado lineal o ramificado.

4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el compuesto de fórmula (I) se selecciona del grupo de compuestos que comprende: (4-nitro-fenil)-amina, metil-(4-nitro-fenil)-amina, etil-(4-nitro-fenil)-amina, dimetil-(4-nitro-fenil)-amina, (4-nitro-fenil)-propil-amina, isopropil-(4-nitro-fenil)-amina, 2-(4-nitro-fenilamino)-etanol, 3-(4-nitro-fenilamino)-propan-1-ol, 4-nitro-N-(piridin-2-ilmetil)anilina, 4-nitro-N-(piridin-2-ilmetil)anilina y ácido 3-((4-nitro-fenilamino)-metil)-benzoico.

5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el al menos un compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo se combina con al menos una sustancia activa adicional seleccionada del grupo que consiste en disulfuro de dialilo, aceite gálico, isotiocianato de alilo, ácido desoxicólico, ácido quenodesoxicólico y derivados de los mismos.

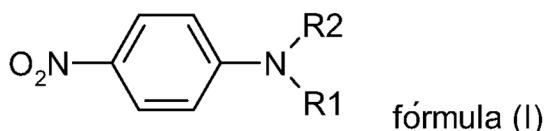
6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el animal rumiante se selecciona del grupo que consiste en: ganado vacuno, cabras, ovejas, bisonte americano, bisonte europeo, yaks y búfalo de agua.

7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la producción de metano en rumiantes calculada en litros por kilogramo de ingesta de materia seca se reduce en al menos 10% cuando se mide en cámaras metabólicas.

8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la cantidad del al menos un compuesto activo como el definido en la fórmula (I) administrada al animal rumiante es de 1 mg a 10 g por kg de pienso.

9. Una composición de pienso o aditivo para piensos que comprende al menos un compuesto de fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, siendo la composición de pienso una premezcla de minerales, una premezcla de vitaminas o una premezcla que incluye vitaminas y minerales o un bolo.

10. Un método para reducir la producción de metano que emana de las actividades digestivas de los rumiantes que comprende administrar oralmente al animal una cantidad suficiente de al menos un compuesto de fórmula (I) o una sal del mismo,



en donde R^1 y R^2 independientemente uno de otro representan H, $-CH_3$ o $-CH_2R^3$, y en donde R^3 es un grupo hidrocarbonado C_1-C_8 saturado o insaturado, lineal, ramificado o cíclico, opcionalmente sustituido con de 1 a 3 grupos seleccionados de $-OH$, $-NH_2$, $-COOH$, y en donde uno o dos de los átomos de carbono en el hidrocarburo C_1-C_8 está opcionalmente sustituido con un átomo de nitrógeno u oxígeno.

11. Un método según la reivindicación 10, en el que el al menos un compuesto de fórmula (I) se administra al animal en combinación con al menos una sustancia activa adicional seleccionada del grupo que consiste en disulfuro de dialilo, aceite gálico, isotiocianato de alilo, ácido desoxicólico, ácido quenodesoxicólico y derivados de los mismos.

12. Un método según las reivindicaciones 10 u 11, en el que el animal rumiante se selecciona del grupo que consiste en: ganado vacuno, ovejas, cabras, jirafas, bisonte americano, bisonte europeo, yaks, búfalo de agua, ciervos, camellos, alpacas, llamas, ñu, antílope, berrendo y nilgó.

5 13. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que la cantidad del al menos un compuesto de fórmula (I) administrada al animal rumiante es de 1 mg a 10 g por kg de pienso.

10 14. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en el que la producción de metano en rumiantes calculada en litros por kilogramo de ingesta de materia seca se reduce en al menos 10% cuando se mide en cámaras metabólicas.