

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 413**

51 Int. Cl.:

A23K 20/00 (2006.01)

A23K 50/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2003** **E 03727415 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016** **EP 1505884**

54 Título: **Método de reducción de la producción de metano que emana de las actividades digestivas de un animal**

30 Prioridad:

14.05.2002 SE 0201448

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

27.09.2016

73 Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)

HET OVERLOON 1

6411 TE HEERLEN, NL

72 Inventor/es:

LOSA, RICCARDO

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 584 413 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

Método de reducción de la producción de metano que emana de las actividades digestivas de un animal

La presente invención se refiere a un método de reducción de la producción de metano que emana de las actividades digestivas de un animal usando, como principio activo, uno o más compuestos de aceite esencial seleccionados del grupo consistente de eugenol, limoneno, un salicilato, quinolina, vainilla, timol o un cresol. Los compuestos activos pueden administrarse por vía oral mediante un pienso o un agua para beber.

El metano es un gas de invernadero, que es muchas veces más potente que el CO₂. Su concentración en la atmósfera se ha duplicado durante el último siglo y continúa aumentando de manera alarmante. Los rumiantes son los contribuyentes mayores a la formación biogénica del metano, y se ha estimado que la prevención de la formación del metano de los rumiantes casi estabilizaría las concentraciones atmosféricas del metano. Además, la nueva evaluación reciente del protocolo de Kioto establece un aumento de la prioridad a la disminución de las emisiones de metano como parte de una estrategia de gases múltiples. Los aditivos para piensos más eficaces para reducir la formación de metano contienen antibióticos e ionóforos que disminuyen la formación de microorganismos proporcionando H₂ a los metanógenos. Sin embargo, el efecto del antibiótico y los ionóforos en la formación del metano es limitado.

Además de aumentar los gases de invernadero, el metano producido durante la fermentación anaerobia también representa una pérdida de energía para el animal huésped. Los hidratos de carbono constituyen del 70 % al 80 % de la materia seca en una ración típica de ganado lechero, y a pesar de esto, la absorción de hidratos de carbono del tubo digestivo es normalmente muy limitada. La razón para esto es la extensa fermentación de los hidratos de carbono en el rumen, dando como resultado la producción de acetato, propionato y butirato como productos principales. Estos productos son parte de los denominados ácidos grasos volátiles, VFA. La fermentación que produce el VFA, por ejemplo, el ácido propiónico, también proporciona energía y carbono para el crecimiento y el mantenimiento de la comunidad microbiana. Los VFA son subproductos importantes de la actividad microbiana.

En el artículo de J.D. Evans et al.: "Effects of thymol on ruminal microorganism" se desvela que el timol es un potente reductor de metano, pero también de acetato y propionato. Además, el artículo de R. Losa: "The use of essential oils in animal nutrition" menciona que la adición de aceites esenciales a un pienso para animales puede afectar positivamente la eficiencia del pienso y el aumento de peso diario de los animales. El documento WO 99/59430 desvela que el uso de timol alivia, cura o previene enfermedades producidas por *Clostridium sp.* en los tubos digestivos de los animales.

Además, en los últimos años ha habido un debate intenso acerca del uso de productos químicos y antibióticos en los aditivos para piensos y en muchos países está siendo considerada una prohibición sobre este tipo de adiciones a los aditivos para piensos. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de que la agricultura desarrolle sustancias que estén de acuerdo con la práctica fiable y generalmente aceptada y no de una naturaleza medicinal.

El propósito de la presente invención es proporcionar un componente que no sea de naturaleza medicinal y que reduzca fuertemente la formación de metano, pero mantenga la actividad microbiana y el contenido de VFA, por ejemplo, el ácido propiónico, a niveles normales.

Ahora se ha encontrado que compuestos de aceite esencial simple o mezclas de dos o más compuestos de aceite esencial, que están presentes en diferentes partes de las plantas de utilidad cultivadas, pueden reducir esencialmente la formación de metano y todavía mantener la actividad microbiana general en un alto nivel.

Más específicamente, la presente invención se refiere a un método de reducción de la producción de metano que emana de las digestiones de un animal usando uno o más compuestos de aceite esencial seleccionados del grupo que consiste en limoneno, eugenol, un salicilato, quinolina y vainilla, que se administran al animal.

Los compuestos de aceite esencial se administran adecuadamente por vía oral mediante los piensos para animales y el agua para beber, pero también pueden usarse comprimidos y cápsulas. Los compuestos de aceite esencial tienen un efecto reductor del metano considerable mientras su efecto sobre la formación de VFA es evidentemente más bajo. Los compuestos de aceite esencial representados por los salicilatos, quinolina y vainilla tienen un efecto reductor del metano, así como un efecto promotor de la formación de VFA. El timol y especialmente los cresoles tienen un fuerte efecto reductor del metano y un notable efecto reductor de la formación de VFA. Los compuestos de aceite esencial activos como se describieron anteriormente se administran adecuadamente por día en una cantidad de 0,01-50 mg/kilogramo de peso corporal del animal, preferentemente 0,1-20 mg/kilogramo de peso corporal del animal.

Adecuadamente, una mezcla de compuestos de aceite esencial, mezcla que contiene:

a) 5-100 % en peso de limoneno, eugenol o una mezcla de los mismos,

b) 0-95 % en peso de uno o más compuestos de aceite esencial seleccionados del subgrupo que consiste en salicilato, tal como salicilato amilo y salicilato bencilo, quinolina y vainilla,

c) 0-60 % en peso de timol, cresol, tal como m-cresol, o una mezcla de los mismos.

En una realización de la invención, la mezcla de los compuestos de aceite esencial contiene

a) limoneno y/o eugenol,

5 b) uno o más compuestos de aceite esencial seleccionados del grupo que consiste en salicilato, tal como salicilato amilo y salicilato bencilo, quinolina y vainilla en una cantidad del 20-300 % en peso, basada en la cantidad de limoneno y eugenol, y

c) timol, cresol, tal como m-cresol, o una mezcla de los mismos, en una cantidad de 0-50 % en peso de la cantidad de limoneno y eugenol.

10 Esta mezcla de compuestos de aceite esencial reduce considerablemente la formación de metano y mantiene la formación de VFA en un nivel deseable. En caso que se desee una alta disminución en la formación de metano, el cresol y/o timol podrían incorporarse en la mezcla en una cantidad total del 10-50 % en peso de la cantidad de limoneno y eugenol.

15 La incorporación de los compuestos de aceite esencial de la invención en el pienso para animales o en el agua para beber se hace adecuadamente añadiéndolos directamente a una composición de pienso para animales o agua para beber, o a un aditivo de premezcla de pienso o un suplemento de agua para beber. Adecuadamente, la premezcla de pienso contiene 0,1-20 % en peso seco de los compuestos de aceite esencial, 0-20 % en peso seco de aditivos que mejoran el crecimiento y saborizantes y 10-99 % en peso de un soporte absorbente. Ejemplos de aditivos que mejoran el crecimiento y saborizantes adecuados son cresol, anetol, deca-, undeca- y/o dodeca-lactonas, iononas, ironas, gingerol, piperidina, ftalida de propilideno, ftalida de butilideno, capsaicina y/o tanina. El soporte puede
20 contener, por ejemplo, 40-50 % en peso de fibras de madera, 8-10 % en peso de estearina, 4-5 % en peso de polvo de cúrcuma, 4-5 % en peso de polvo de romero, 22-28 % en peso de caliza, 1-3 % en peso de una goma, tal como goma arábica, 5-50 % en peso de un azúcar y/o almidón y 5-15 % en peso de agua. Esta premezcla también puede contener 0-89 % en peso de otros componentes para pienso, seleccionados adecuadamente del grupo que consiste en vitaminas, enzimas, sales minerales, cereales molidos, componentes que contienen proteínas, componentes que
25 contienen hidratos de carbono, trigo molido y/o salvados. El aditivo de la premezcla se añade adecuadamente en la preparación de una composición de pienso según la invención en cantidades tales que el pienso contendrá 0,1-2500 ppm, preferentemente 1-1000 ppm, del compuestos de aceite esencial. La premezcla normalmente constituye el 0,3-3,5 % en peso de la composición de pienso.

30 La composición de pienso según la invención normalmente contiene, calculados basándose el peso seco del pienso, los siguientes componentes.

a) 0-80 %, preferentemente 10-70 %, en peso de cereales,

b) 0-30 %, preferentemente 1-12 %, en peso de grasa,

c) 0-85 %, preferentemente 10-50 %, en peso de sustancias nutritivas que contienen proteína de un tipo distinto de cereales, y

35 d) 0,1-2500 ppm, preferentemente 1-1000 ppm, del compuestos de aceite esencial.

Las cantidades totales de a)-d) son preferentemente al menos el 80 % en peso.

40 Cuando se prepara la composición de pienso, la premezcla del pienso puede mezclarse con los componentes secos que consisten de cereales, tales como trigo molido o triturado, avena, cebada, maíz y arroz; fuentes de proteína vegetal basadas en, por ejemplo, semilla de colza, semilla de soja y de girasol; fuentes de proteína animal, tales como harina de pescado, molasas y productos lácteos, tales como diversos polvos de leche y polvos de suero. Después de mezclar todos los aditivos secos, pueden añadirse los componentes líquidos y los componentes que después de calentarse se vuelven líquidos. Los componentes líquidos pueden consistir de líquidos, tales como
45 grasa, por ejemplo, grasa vegetal, opcionalmente licuada por el calentamiento y/o de ácidos carboxílicos, tal como un ácido graso. Después de mezclar completamente, se obtiene una consistencia harinosa o en partículas dependiendo del grado de molienda de los componentes. Para prevenir la separación durante el almacenamiento preferentemente debe añadirse agua al pienso para animales, que luego es sometido a un proceso convencional de peletización, expansión o de extrusión. Cualquier exceso de agua puede eliminarse por secado. Si se desea, el pienso para animales granulado resultante también puede machacarse a un tamaño de partícula más pequeño. La composición de pienso descrita es normalmente la administrada en combinación con follaje verde seco y/o ensilaje.

50 El suplemento de agua para beber puede contener 1-99 % en peso seco, preferentemente 10-50 % en peso seco, de los compuestos de aceite esencial. Además de los compuestos de aceite esencial, el suplemento también puede contener 1-99 % en peso seco de un gran número de otros componentes. Ejemplos de otros componentes son sales minerales, vitaminas, aditivos que mejoran la salud y el crecimiento, saborizantes, vehículos solubles en agua o dispersables en agua, tales como azúcares, leche en polvo, subproductos de la leche y derivados de celulosa,

agentes dispersantes y estabilizadores, tales como polímeros solubles en agua o dispersables en agua. Cuando se prepara el agua para beber, el suplemento normalmente se añade al agua en una cantidad tal que la concentración de los compuestos de aceite esencial llegue a ser 1-2500 ppm, preferentemente 1-1000 ppm.

- 5 Dentro del alcance de la invención también es posible producir una suspensión de la composición de pienso. Esto es especialmente conveniente si el pienso se prepara para consumo inmediato.

La presente invención se ilustrará ahora adicionalmente por los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Se probó la eficacia de algunos compuestos de aceite esencial obtenibles de plantas con respecto a su influencia sobre la formación de metano y VFA en un sistema *in vitro*.

- 10 Según la prueba, 200 mg de una dieta molida, que contiene 50 % de paja, 30 % de cebada, 9,5 % de molasas, 10 % de harina de pescado y 0,5 % de vitaminas, se añadió a botellas de Wheaton. A un triplicado de botellas que contenían la dieta se les añadió a cada una de las botellas 0,6 ml de una disolución de uno de los compuestos de aceite esencial mencionados en la siguiente tabla, en propilenglicol.

- 15 Se alimentaron tres ovejas con la dieta molida, y fluidos del rumen filtrados en cantidades de 500 ml se mezclaron con 1000 ml de un tampón Colemans Simplex. El tampón tuvo la siguiente composición.

Tampón Colemans Simplex

Premezcla de una solución salina, g/l

K ₂ HPO ₄	12,7
KH ₂ PO ₄	10,0
NaCe	1,3
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,18
CaCl ₂ (seco)	0,09

Tampón

Solución salina	40 ml
5 % (peso/volumen) de NaHCO ₃	15 ml
2 % de sal de HCl de cisteína	1,1 ml
Agua	60 ml

- 20 Entonces se introdujeron en las botellas 30 ml del fluido del rumen combinado y el tampón y sus contenidos se incubaron bajo CO₂ a 39 °C durante 24 horas. Entonces se midieron la producción de metano y la cantidad total de VFA.

Los siguientes resultados obtenidos se muestran en la Tabla I.

Tabla I

Prueba	Compuestos de aceite esencial		Producción de metano mmol/24 horas	VFA total mmol/24 horas
	Tipo	Cantidad de disolución % en peso		
Control	Agua	-	1255	1250
1	Vainilla	2	1055	1300
2	Timol	5	250	400
3	Oxoforona	0,4	1400	1350
4	m-cresol	9	150	200

Prueba	Compuestos de aceite esencial		Producción de metano mmol/24 horas	VFA total mmol/24 horas
	Tipo	Cantidad de disolución % en peso		
5	Resorcinol	1,4	1350	1375
6	Limoneno	1	550	1250
7	Quinolina	1	900	1300
8	Guajacol	3,6	1350	1250
9	Eugenol	3	300	800
10	Salicilato de bencilo	3	850	1600

Los resultados muestran claramente que los compuestos de aceite esencial según la invención tienen posibilidades de reducir considerablemente la producción de metano, mientras que la formación de VFA no se reduce en el mismo grado.

5 Ejemplo 2

Se probó *in vivo* en ovejas el efecto de una mezcla de cantidades iguales de las disoluciones de los compuestos de aceite esencial mencionados en el Ejemplo 1 sobre la producción de metano y VFA. Según la prueba, cuatro ovejas maduras, cada una adaptada con una cánula en el rumen, se alimentaron con 1,0 kg de pienso (peso seco)/día de una mezcla de piensos que contenía 40 % en peso de una composición de pienso que consistía en trigo, maíz, cebada, soja, semilla de girasol, harina pescado, guisantes y semilla de colza y 60 % en peso de ensilaje de pasto, en dos comidas iguales. Las ovejas recibieron la dieta sin o con la mezcla en una dosis de 110 mg por animal y día. El efecto de la mezcla se evaluó según un diseño latino del cuadrado con 4 filas y 4 columnas, durando cada período 6 semanas. No se recogieron muestras de la oveja durante las 4 semanas iniciales del periodo con el fin de permitir que el contenido de sus rúmenes se adaptara a la nueva dieta. Después de las 4 semanas iniciales, los fluidos del rumen se recogieron inmediatamente antes de la alimentación y se filtraron a través de una capa doble de muselina. La incubación de cada fluido del rumen filtrado se realizó por duplicado a 39 °C en jeringas Menke. Para una explicación adicional véase K.A. Menke y Steingass (1989), Animal Research and Development, 28, p 7-55. La cantidad total de VFA se determinó después de 0, 1, 2, 3 y 7 horas, mientras que la cantidad de metano se midió después de 4 y 24 horas usando cromatografía de gases.

20 Se obtuvieron los siguientes resultados.

		Control	Mezcla
Metano	ml/4 horas	6,7	6,3
	ml/24 horas	12,1	10,1
Cantidad total de ácidos grasos volátiles, mmol/l	0 horas	41,6	42,2
	1 horas	65,8	68,5
	2 horas	70,8	73,2
	3 horas	63,9	67,0
	7 horas	54,2	57,5

De los resultados es evidente que la producción de metano fue inferior cuando la dieta contuvo la mezcla según la invención en comparación con el control. Además, el VFA total fue más alto, que también indica una actividad satisfactoria del rumen y un aumento del crecimiento de los animales.

25 Ejemplo 3

Se preparó una mezcla de compuestos de aceite esencial. La mezcla contuvo

0,24 ml de la disolución de limoneno en la prueba 6, Ejemplo 1,

0,12 ml de la disolución de eugenol en la prueba 9, Ejemplo 1,
 0,06 ml de la disolución de quinolina en la prueba 7, Ejemplo 1,
 0,06 ml de la disolución de salicilato de bencilo en la prueba 10, Ejemplo 1,
 0,06 ml de la disolución de vainilla en la prueba 1, Ejemplo 1,
 5 0,03 ml de la disolución de timol en la prueba 2, Ejemplo 1, y
 0,03 ml de la disolución de m-cresol en la prueba 4, Ejemplo 1.

Se probó la eficacia de esta mezcla del mismo modo que en el Ejemplo 1. Se obtuvieron los siguientes resultados:

	Mmoles de metano	Mmoles de VFA
Control	761	430
Mezcla	176	266

10 De los resultados es evidente que la disminución en la formación de metano es importante en la presencia de la mezcla de los compuestos de aceite esencial según la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un método de reducción de la producción de metano que emana de las actividades digestivas de un animal y que mantiene la actividad microbiana y el contenido de ácidos grasos volátiles a niveles normales usando un compuesto de aceite esencial que comprende:
- 5 a) 5-100 % en peso de limoneno, eugenol o una mezcla de los mismos;
- b) 0-95 % en peso de uno o más compuestos de aceite esencial seleccionados del grupo que consiste en salicilato, quinolina y vainilla; y
- c) 0-60 % en peso de timol, cresol o una mezcla de los mismos.
- 10 2. Un método de reducción de la producción de metano que emana de las actividades digestivas de un animal y que mantiene la actividad microbiana y el contenido de ácidos grasos volátiles a niveles normales usando compuesto de aceite esencial que comprende:
- a) limoneno, eugenol o una mezcla de los mismos;
- b) uno o más compuestos de aceite esencial seleccionados del grupo que consiste en salicilato, quinolina y vainilla en una cantidad del 20-300 % en peso basado en la cantidad total de limoneno y eugenol; y
- 15 c) timol, cresol o una mezcla de los mismos en una cantidad del 0-50 % en peso basado en la cantidad total de limoneno y eugenol.
3. Un método según la reivindicación 1 o 2, en el que la cantidad de timol, cresol o la mezcla de los mismos es el 10-50 % en peso de la cantidad total de limoneno y eugenol.
- 20 4. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que los compuestos de aceite esencial se administran por día en una cantidad de 0,01-50 mg por kilo de peso corporal del animal.
5. El método según la reivindicación 1 o 2, en el que los compuestos de aceite esencial se administran mediante una composición de pienso o un agua para beber.