

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 611**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 31/194</b>	(2006.01)	<b>A23K 50/60</b>	(2006.01)	<b>C07F 15/02</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/198</b>	(2006.01)	<b>A23K 50/75</b>	(2006.01)	<b>C07F 13/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/19</b>	(2006.01)	<b>A23K 50/10</b>	(2006.01)	<b>A61K 31/30</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/28</b>	(2006.01)	<b>A23K 20/20</b>	(2006.01)	<b>C07F 1/08</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/295</b>	(2006.01)	<b>A23K 20/195</b>	(2006.01)	<b>A23K 50/30</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/305</b>	(2006.01)	<b>A23K 20/10</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/315</b>	(2006.01)	<b>A23K 20/158</b>	(2006.01)		
<b>A61K 33/02</b>	(2006.01)	<b>A23K 20/142</b>	(2006.01)		
<b>A61P 31/04</b>	(2006.01)	<b>A23K 20/105</b>	(2006.01)		
<b>A23L 33/165</b>	(2006.01)	<b>C07F 3/06</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.05.2013 PCT/IB2013/054391**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2014 WO14001924**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2013 E 13771598 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 2866799**

54 Título: **Quelatos de microelementos antibacterianos y uso de los mismos en piensos para animales**

30 Prioridad:

**29.06.2012 HU P1200394**

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

**11.03.2019**

73 Titular/es:

**DR. BATA ZRT. (100.0%)  
13902 hrsz.  
6000 Kecskemét, HU**

72 Inventor/es:

**BATA, ÁRPÁD y  
KUTASI, JÓZSEF**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

Observaciones:

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

**ES 2 703 611 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

Quelatos de microelementos antibacterianos y uso de los mismos en piensos para animales

La presente invención se refiere a un compuesto complejo de quelato orgánico de oligoelemento, para la inhibición de bacterias patógenas facultativas. La presente invención se refiere además a una composición, al aditivo para piensos o al pienso que comprende los compuestos, así como a métodos para la preparación de los mismos, y para su uso en la cría de animales.

Los minerales desempeñan un papel diverso y esencial en las operaciones fisiológicas y bioquímicas de los organismos vivos. Son componentes de enzimas (Zn, Cu, Mn, Mg, Fe) y vitaminas (Co), entre otras. Desempeñan un papel definitivo en diferentes mecanismos de protección (Cu, Zn, Fe, Se). Juegan un papel en la hematopoyesis (Cu, Fe), la reproducción (P, Cu, K, Mn, Zn, Mg). Facilitan la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas. El contenido mineral de los cultivos forrajeros depende de varios factores, como el lugar taxonómico de la planta, la composición y el pH del suelo, la distribución anual de la precipitación, la tecnología agronómica y muestra muy alta variabilidad. En los períodos secos, el contenido mineral de los cultivos forrajeros disminuye. Aumenta al comienzo de la fase fenológica de las plantas, luego, después de alcanzar un máximo, comienza a disminuir. La lixiviación que se produce en la cosecha o en el caso de la pérdida de hojas de las plantas vexilares también se acompaña de una pérdida significativa del contenido mineral. Durante la reposición del suelo, el abandono del uso de estiércol de ganado interrumpió el equilibrio de recirculación del suelo, los suelos continúan acidificándose y debilitándose.

Entre la ganadería, para la determinación de las demandas minerales de los animales que comen forraje (cerdos, aves de corral), los inventores pueden actualmente apoyarse mejor en el contenido mineral de los cultivos forrajeros, tal como se proporciona en las tablas de alimentación, que en el caso de los alimentos de forraje. En las partes germinativas de las plantas, como las semillas, la fluctuación del contenido mineral es menos profunda que en las partes vegetativas, como los tallos y las hojas. Pero aun con esto, la variación puede ser 2-3 veces mayor en el caso de las semillas. Sin embargo, el ganado criado a alto rendimiento requiere un enriquecimiento de minerales aumentado y equilibrado (incluidos oligoelementos). En la actualidad, este requisito se satisface únicamente mediante la alimentación al mezclar oligoelementos en la alimentación provista, principalmente utilizando diferentes sales minerales.

El nivel del enriquecimiento requerido no se puede planificar sin conocer la composición del alimento básico y la cantidad de forraje adicional. Los requisitos son diferentes según la especie, el grupo de edad y los tipos de utilización. La falta de suministro de minerales en el alimento se puede determinar de dos maneras. La insuficiencia primaria es cuando el elemento dado es escaso en la alimentación. La insuficiencia secundaria ocurre cuando el cuerpo no puede utilizar el elemento agregado al alimento, por ejemplo, falta un factor necesario para absorberlo, o la dominancia de los elementos antagónicos inhibe la absorción de los elementos dados. (Kakukk-Schmidt, 1988).

Los oligoelementos pertenecen al grupo de compuestos minerales, elementos metálicos o no metálicos que aparecen en cantidades muy pequeñas en el cuerpo de la planta o animal. Según su función, pueden funcionar como elementos estáticos, homeostáticos o enzimáticos (Fe, Zn, Cu, Mn, Mo, I, Ni, Se, Cr). En el caso de su insuficiencia, pueden clasificarse como elementos esenciales, sin embargo, en alta concentración pueden ser tóxicos. Por lo tanto, determinado oligoelemento puede ser esencial o tóxico, dependiendo de la concentración de la cual está presente en el organismo (Kakukk-Schmidt, 1988). Los minerales pueden ser absorbidos en forma ionizada, como cationes o aniones, o acoplados a una proteína transportadora, o por transporte activo dentro del organismo (excepto el potasio). Los iones de los metales pueden formar complejos metálicos unidos de forma reversible con ligandos donadores de electrones, estos son los llamados quelatos. Este proceso consume una cantidad significativa de ATP (Kakukk-Schmidt, 1988). El ion metálico cargado positivamente actúa como un ácido de Lewis en un ambiente acuoso, y de esta manera puede reaccionar con un donante de electrones (base de Lewis) mientras se forma un compuesto complejo coordinado o un ion coordinado. El efecto electrostático de los quelatos solo se puede observar en la fase acuosa (aquaquelatos). Por lo tanto, de otra manera los compuestos insolubles se vuelven absorbibles una vez disueltos en forma de complejos metálicos. Estudios anteriores, con ácido húmico y humo-quelatos producidos con hidrolizados de algas o alginatos, demostraron que los quelatos metálicos se utilizan mejor que las sales metálicas. No se propagaron ampliamente porque, aunque se requiere menos, el costo de producción fue muy alto (Kakukk-Schmidt, 1988).

El efecto biológico de los elementos está muy influenciado por la forma química de los mismos. Las sales metálicas, como los cloruros, los sulfatos, se utilizan mejor que los óxidos o carbonatos (Kakukk-Schmidt, 1988). Las fábricas que producen premezclas utilizan las formas inorgánicas de los oligoelementos, a pesar del hecho de que estos elementos están presentes en las plantas principalmente en compuestos orgánicos. La investigación científica de los últimos 10-15 años dejó claro que utilizar oligoelementos en enlaces orgánicos es ventajoso en comparación con las formas inorgánicas. El complejo orgánico que contiene metal es una de las formas de compuestos principales en los sistemas biológicos. El ion metálico ocupa la posición central en los complejos, iones, moléculas, compuestos orgánicos naturales (aminoácidos, péptidos, proteínas, carbohidratos, etc.), es decir, los ligandos se unen a éste. La reacción química entre determinados iones y compuestos orgánicos produce quelatos, cuando el ion metálico está unido a dos o más átomos de un ligando. Los compuestos quelatos con interacciones metal-ligando son los más valiosos para el organismo, ya que la actividad de los metales en estos complejos es  $10^5$  -  $10^7$  veces más que en forma ionizada.

Los quelatos pueden ser quelatos de transferencia, almacenamiento y metabólicos según sus funciones. Los quelatos metabólicos son compuestos con estructura de porfirina (como hemoglobina, clorofila), con iones  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  dentro de sus núcleos, entre otros. Los quelatos de transferencia suelen ser aminoácidos (glicina, cistina, histidina) y rara vez también pueden ser péptidos (Kakukk-Schmidt, 1988). En el caso de la mayoría de los oligoelementos, se forman los siguientes complejos de quelatos: complejos formados con aminoácidos, proteínas, ácidos orgánicos, etc., de los cuales los complejos de oligoelementos de proteínas (aminoácidos) son elementales. Para disminuir el requisito de ion  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Cr}^{3+}$  suficiente para los animales, se necesitan aditivos para piensos mejor utilizados que los disponibles actualmente en el campo de la cría de ganado. Se sabe por la bibliografía que el oligoelemento proporcionado en forma orgánica se utiliza mejor, pero el nivel de utilización depende de la estructura química del compuesto utilizado. Además de la mejor utilización del oligoelemento, en el caso de un oligoelemento mezclado con la alimentación, la interacción de los elementos puede disminuir significativamente (Du, 1994, Shi *et al.*, 1995, Mahan, 1997).

Según los resultados de estudios y experiencias prácticas, la absorción y el efecto biológico de los oligoelementos en los enlaces orgánicos es más ventajoso, sin embargo, las cantidades adecuadas para satisfacer los requisitos deben determinarse para cada oligoelemento y especie animal. Esto es aún más importante porque la concentración máxima del oligoelemento administrable en el alimento, con razón, está disminuyendo continuamente debido a las rigurosas normas de seguridad alimentaria y ambiental. La disminución significa en algunos casos que la necesidad del oligoelemento del animal solo puede satisfacerse con un suministro de oligoelementos superior o mejor absorbido.

Al mismo tiempo, varios compuestos inorgánicos tienen un efecto antibacteriano (como sulfato de cobre, óxido de cinc). En su propia experiencia, los inventores encontraron productos que contienen metales (productos con Selevadura) estos complejos metálicos en enlaces orgánicos también tienen propiedades antibacterianas. Sin embargo, este efecto no es útil en la práctica, porque la cantidad de oligoelemento utilizado es tóxico para los animales. Un efecto similar de  $\text{CuSO}_4$  y  $\text{ZnSO}_4$  también se usa durante la fermentación industrial, donde la concentración de oligoelementos tóxicos es más permisiva. Whittaker y colaboradores (1993) encontraron en sus experimentos que los compuestos metálicos que contienen sales metálicas en enlaces de quelatos son útiles, por ejemplo, contra *Helicobacter pylori*. Se han encontrado hallazgos similares en la patente de EE.UU. n° 6.429.225. Cabe señalar que el *Helicobacter pylori* es un patógeno peculiar por varias razones, por ejemplo, que está presente en el ambiente muy ácido del estómago. Por consiguiente, no se puede extraer una conclusión definitiva de las propiedades contra *Helicobacter pylori* de los quelatos de la técnica anterior sobre si y cómo las bacterias presentes en la flora intestinal en general reaccionarían con los compuestos orgánicos de quelato metálico y qué tipos de éstos deberían probarse estos, en todo caso.

Varias solicitudes de patente describen el uso de complejos de quelatos metálicos en la cría de ganado.

La solicitud de patente n° CN1484971A (SHIJIAZHANG CITY KEXING ANIMA; 31 de marzo 2004) describe un alimento para animales que contiene complejos de quelato metálico de aminoácidos. El complejo de quelato comprende quelato de aminoácidos de hierro, cobre, manganeso y cinc, entre otros.

La solicitud de patente n° CN101941931A (HUBEI SHENZHOU CHECIMAL CO LTD.; 12 de enero 2011) describe un método para la preparación de quelatos metálicos de metionina. La metionina y una sal metálica soluble (p. ej., sulfato de cobre, cloruro de cobre, sulfato de cinc, cloruro de cinc, triclورو de cromo, sulfato de hierro, cloruro de hierro) se mezclan en presencia de alcohol, y la mezcla se mantiene a 40-150°C durante 1-8 horas, luego se filtra y se seca. El quelato metálico de metionina se utiliza en la alimentación animal.

La solicitud de patente n° CN101838214A (INST. DE AGRICULTURA SUBTROPICAL, ACADEMIA DE CIENCIAS CHINA; 22 de septiembre 2010) describe un método para la preparación de quelato de cobre DL-treonina. El quelato de cobre de DL-treonina se prepara a partir de quelato de cobre de glicina y acetaldehído. El quelato de cobre de DL-treonina también se utiliza en alimentación animal.

La solicitud de patente número CN101744120A (UNIV. HEBEI AGRICULTURA; 23 Jun. 2010) describe un pienso con oligoelementos preparado para lechones. El pienso comprende quelato de bis-glicinato de hierro, glicinato de cinc, glicina de cobre, sulfato de magnesio, yoduro de potasio y levadura.

La solicitud de patente n° CN102150751A (TANGSHAN NORMAL UNIVERSITY; 17 agosto 2011) describe una premezcla útil en piensos para animales de pelo. La premezcla comprende, entre otros, quelatos de hierro, cinc, manganeso, cobre, selenio y aminoácidos, y se usa preferiblemente durante el embarazo y el período de lactancia de los animales de pelo.

El objeto de los documentos anteriores es la preparación de compuestos metálicos con mejores propiedades de absorción.

El documento WO 2009/066117 describe el uso de EDTA o sus sales para el tratamiento de la disentería porcina causada por *Brachyspira hyodysenteriae*.

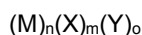
El documento WO2004/080210 describe sales metálicas de cinc y cobre y complejos simples de ácidos inorgánicos y ácidos orgánicos, así como sus propiedades antimicrobianas, haciéndolos no absorbentes en los primeros segmentos del aparato digestivo con un proceso de microencapsulación.

Sadikov G. G. *et al.* (*Crystallography Report* vol. 49, nº 6, 2004, págs. 990-997) describe la estructura de  $Zn_3(HEDTA)_2(H_2O)_6$ .

Holzhauser M. *et al.* (*Veterinary Records*, (2011) 169, 555) describe un tratamiento tópico con cobre activado (como cobre EDTA diamónico) y cinc (como cinc EDTA diamónico) en el que el amonio está presente como contra-ion.

5 El nuevo descubrimiento de los inventores en el mecanismo de acción de los quelatos orgánicos es que determinados compuestos complejos, solos o en combinación, son capaces de inhibir la proliferación de bacterias patógenas en el tubo intestinal, lo que permite el predominio de miembros útiles de la flora intestinal normal. (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*). La técnica anterior no sugirió un efecto antibacteriano para los complejos quelatos de oligoelementos de aminoácidos.

10 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un complejo de quelato orgánico con oligoelemento que tiene la fórmula general



en donde M es Zn, Cu, Fe, Mn, Ag;

X es  $NH_3$ ,  $H_2O$ ;

15 Y es un aminoácido (preferiblemente seleccionado del grupo consistente en los 20 aminoácidos naturales), un ácido graso preferiblemente ácido fórmico, ácido acético o ácido propiónico), hidroxiácido (preferiblemente ácido maleico o ácido láctico) y/o ácido poliamino-carboxílico (preferiblemente ácido nitrilotriacético o ácido etilendiamintetraacético);

n es 1-6;

m es 1-6;

20 o es 1-8,

en donde el complejo se selecciona del grupo consistente en:

bisglicinato de cobre ( $H_2O$ ), bisglicinato de cobre ( $H_2O$ )<sub>2</sub>, bismalato Cu ( $H_2O$ ), ácido etilendiamintetraacético Cu

( $H_2O$ )<sub>2</sub>, bisglicinato de cinc ( $H_2O$ ), ácido etilendiamintetraacético Zn ( $H_2O$ )<sub>2</sub>, malato Zn ( $H_2O$ )<sub>2</sub>, bisalaninato Zn ( $H_2O$ ),

25 bisaspartato Zn ( $H_2O$ ), bisbutirato Zn ( $H_2O$ ), bisglutamato Zn ( $H_2O$ ), bispropionato Zn ( $H_2O$ ), bisvalerianato Zn ( $H_2O$ ),

bismalato Zn ( $H_2O$ ), bisglicinato de cobre ( $NH_3$ )<sub>2</sub>, ácido etilendiamintetraacético de cobre ( $NH_3$ )<sub>2</sub>, bismalato de cobre

( $NH_3$ )<sub>2</sub>, asparaginato Cu ( $NH_3$ )<sub>2</sub>, bisasparaginato Cu ( $NH_3$ )<sub>2</sub>, bisglutamato Cu ( $NH_3$ )<sub>2</sub>, glutamato Cu ( $NH_3$ )<sub>2</sub>, bismalato

de cinc ( $NH_3$ )<sub>2</sub>, ácido etilendiamintetraacético de cinc ( $NH_3$ )<sub>2</sub>, malato de cinc ( $NH_3$ )<sub>2</sub>, metionato de cinc ( $NH_3$ )<sub>2</sub>,

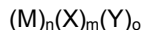
30 bisglicinato de cinc ( $NH_3$ )<sub>4</sub>, malato de cinc ( $NH_3$ )<sub>4</sub>, asparaginato Zn ( $NH_3$ )<sub>2</sub>, aspartato Zn ( $NH_3$ )<sub>2</sub>, bisasparaginato Zn

( $NH_3$ )<sub>2</sub>, bisaspartato Zn ( $NH_3$ )<sub>2</sub>, bisglutamato Zn ( $NH_3$ )<sub>2</sub>, bisglicinato Zn ( $NH_3$ )<sub>2</sub>, bishistidinato Zn ( $NH_3$ )<sub>2</sub>, citrato Zn

( $NH_3$ )<sub>2</sub>, glutamato Zn ( $NH_3$ )<sub>2</sub>.

En otro aspecto de la invención, se refiere a un compuesto complejo de quelato orgánico con oligoelemento que

tiene la fórmula general



en donde M es Zn, Cu, Fe, Mn, Ag;

35 X es  $NH_3$ ,  $H_2O$ ;

Y es un aminoácido (preferiblemente seleccionado del grupo consistente en los 20 aminoácidos naturales), un ácido graso preferiblemente ácido fórmico, ácido acético o ácido propiónico), hidroxiácido (preferiblemente ácido maleico o ácido láctico) y/o ácido poliamino-carboxílico (preferiblemente ácido nitrilotriacético o ácido etilendiamintetraacético);

n es 1-6;

40 m es 1-6;

o es 1-8.

En una realización preferida, el compuesto complejo de quelato orgánico con oligoelemento se selecciona del grupo consistente en:

bisglicinato de cobre ( $H_2O$ ), bisglicinato de cobre ( $H_2O$ )<sub>2</sub>, bismalato Cu ( $H_2O$ ), ácido etilendiamintetraacético Cu

45 ( $H_2O$ )<sub>2</sub>, bisglicinato de cinc ( $H_2O$ ), ácido etilendiamintetraacético Zn ( $H_2O$ )<sub>2</sub>, malato Zn ( $H_2O$ )<sub>2</sub>, bisalaninato Zn ( $H_2O$ ),

bisaspartato Zn ( $H_2O$ ), bisbutirato Zn ( $H_2O$ ), bisglutamato Zn ( $H_2O$ ), bispropionato Zn ( $H_2O$ ), bisvalerianato Zn ( $H_2O$ ),

bismalato Zn ( $H_2O$ ), bisglicinato de cobre ( $NH_3$ )<sub>2</sub>, ácido etilendiamintetraacético de cobre ( $NH_3$ )<sub>2</sub>, bismalato de cobre

( $NH_3$ )<sub>2</sub>, asparaginato Cu ( $NH_3$ )<sub>2</sub>, bisasparaginato Cu ( $NH_3$ )<sub>2</sub>, bisglutamato Cu ( $NH_3$ )<sub>2</sub>, glutamato Cu ( $NH_3$ )<sub>2</sub>, bismalato

50 de cinc ( $NH_3$ )<sub>2</sub>, ácido etilendiamintetraacético de cinc ( $NH_3$ )<sub>2</sub>, malato de cinc ( $NH_3$ )<sub>2</sub>, metionato de cinc ( $NH_3$ )<sub>2</sub>,

bisglicinato de cinc ( $NH_3$ )<sub>4</sub>, malato de cinc ( $NH_3$ )<sub>4</sub>, asparaginato Zn ( $NH_3$ )<sub>2</sub>, aspartato Zn ( $NH_3$ )<sub>2</sub>, bisasparaginato Zn

( $NH_3$ )<sub>2</sub>, bisaspartato Zn ( $NH_3$ )<sub>2</sub>, bisglutamato Zn ( $NH_3$ )<sub>2</sub>, bisglicinato Zn ( $NH_3$ )<sub>2</sub>, bishistidinato Zn ( $NH_3$ )<sub>2</sub>, citrato Zn

( $NH_3$ )<sub>2</sub>, glutamato Zn ( $NH_3$ )<sub>2</sub>.

Más realizaciones preferidas de la invención se detallan en las reivindicaciones dependientes.

55 El documento WO 2009/066117 describe el uso de EDTA o sus sales para el tratamiento de la disentería porcina causada por *Brachyspira hyodysenteriae*. La eficiencia del EDTA o del EDTA sódico utilizado en la misma es inferior a la eficiencia de los complejos de quelato EDTA agua con oligoelemento o de los complejos de quelato EDTA amina con oligoelemento según la presente invención. Los complejos de quelatos formados con las moléculas de agua o las moléculas de amoníaco dan como resultado una estructura de quelato tan ventajosa que actúa como

moléculas de unión a análogos de sideróforos y/o de unión a antibióticos y/o a moléculas señal de QS, e inhiben las bacterias patógenas a una concentración mínima, aproximadamente 10-500 mg/kg.

5 En contraste con el documento WO2004/080210, donde los compuestos ejercen su efecto antimicrobiano por no ser absorbentes en el primer segmento del aparato digestivo debido a su microencapsulación, la presente invención se basa en el descubrimiento de que si además de los complejos de oligoelementos los inventores preparan sus quelatos con O y N de los mismos, entonces la actividad microbiológica de los compuestos especiales así formados es mucho más alta que la de los complejos simples de estos oligoelementos. Según este nuevo descubrimiento, además del compuesto formador del complejo de quelatos con O y N, una molécula de agua u otra molécula formadora de quelatos con O, o amonio u otra molécula formadora de quelatos con N debería estar presente en un enlace donador, dependiendo del microorganismo.

El aminoácido usado se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en los 20 aminoácidos naturales.

El ácido graso usado se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico.

15 El hidroxiaácido usado es preferiblemente ácido maleico o ácido láctico.

El ácido poliamino carboxílico es preferiblemente ácido nitrilotriacético o ácido etilendiamintetraacético.

20 En otra realización, la presente invención se refiere a un compuesto, en donde la bacteria patógena se selecciona del grupo que consiste en: *Salmonella enterica*, *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar *enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella infantis*, *Salmonella gallinarum*, *S. paratyphi*, *S. abortus-equi*, *S. java*, *S. cholerae*, *S. typhisuis*, *S. sendai*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* *Clostridium barati*, *Cl. sordellii*, *Cl. botulinum* A-F, *C. novy* A, B, C, D, *Cl. septicum*, *Cl. Chuvoei*, *Cl. histolyticum*, *C., sporogenes*, *Cl. tetani*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli*, *Arcanobacterium piogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Lawsonia intracellularis*.

25 En una realización preferida, la presente invención se refiere a un compuesto, para el tratamiento o la prevención de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en: enfermedades entéricas de aves de corral, enfermedades entéricas porcinas, enfermedades entéricas bovinas, así como tratamientos superficiales, por ejemplo pododermatitis ulcerativa con dermatitis necrótica de aves de corral, mastitis del ganado lechero, metritis del ganado lechero, lesiones de pezuña de ungulados, enfermedades entéricas y superficiales de otros animales.

30 En una realización adicional, la presente invención se refiere a un compuesto, para la inhibición de bacterias que proliferan y causan enfermedades en la parte del intestino delgado del aparato digestivo y/o para la prevención o tratamiento de enfermedades causadas por dichas bacterias.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende el compuesto según la invención, opcionalmente junto con aditivos convencionales.

35 En otra realización preferida, la presente invención proporciona una composición que comprende al menos dos compuestos de acción sinérgica según la invención, opcionalmente junto con aditivos convencionales.

En realizaciones particularmente preferidas, la composición comprende al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho o más compuestos diferentes, que actúan sinérgicamente según la invención, opcionalmente junto con aditivos convencionales.

40 En otro aspecto, la presente invención proporciona un aditivo para piensos, que comprende el compuesto o composición según la invención.

En otra realización, la invención se refiere a un aditivo para piensos, que está presente en un portador adecuado en forma liberable, preferiblemente un granulado.

En otra realización, la invención se refiere a un pienso, que comprende el compuesto, la composición o el aditivo para pienso según la invención.

45 En otra realización, la presente invención se refiere a un método para preparar un aditivo para piensos, comprendiendo dicho método mezclar el compuesto o composición según la invención, y opcionalmente otros componentes de aditivos para pienso convencional.

50 En una realización adicional más, la presente invención se refiere a un método para preparar un pienso, comprendiendo dicho método mezclar el compuesto, la composición o el aditivo para piensos según la invención para pienso convencional.

En otra realización, la presente invención se refiere al uso de un compuesto, composición, aditivo para piensos o un pienso según la invención en la cría de ganado para aumentar la ganancia de peso corporal y/o aumentar la utilización de pienso y/o aumentar el rendimiento de huevos, y/o disminuir la mortalidad en la población de aves de corral y/o cerdos y/o vacas lecheras.

55 Las ventajas del uso de quelatos orgánicos de metal están respaldados además por el hecho de que al seleccionar un buen ligando, el aditivo también será más barato. La producción de la composición es muy barata, lo que

proporciona una sólida ventaja de precio. Desempeñan un papel importante en la producción económica como agente preventivo con sus propiedades bacteriostáticas/bactericidas. Pueden ser eficaces para recuperar el equilibrio de la flora intestinal, para la producción de la misma y para combatir los microorganismos patógenos facultativos que son un riesgo para la salud de los animales. Además de la pérdida de ganancias debido a la mala utilización de alimento y la pérdida de animales, el costo anual de los antibióticos de las granjas que tienen poblaciones infectadas también es muy alto. En algunos casos, el coste de las composiciones, p. ej., para combatir la disentería porcina en una granja de cerdos de fábrica determinada puede superar el 70% del costo de los medicamentos utilizados. El coste del tratamiento es de alrededor de 2-7,5 \$/animal de promedio. Este tratamiento puede ser reemplazado por la premezcla de quelato de metal orgánico con oligoelemento.

Al mismo tiempo, el glicinato de cobre y cinc proporcionado en forma orgánica no solo se utiliza mejor, sino que sorprendentemente tienen un efecto inhibitor sobre los microorganismos. Las composiciones de quelatos de oligoelementos unidos a compuestos orgánicos combinados entre sí son eficaces para recuperar el equilibrio de la flora intestinal, para la producción de las mismas y para combatir los microorganismos patógenos facultativos que representan un riesgo para la salud de los animales. Los complejos de quelatos orgánicos pueden ser eficaces para enfermedades de etiología complicada, como la colitis porcina, que pueden ser causadas por varias bacterias patógenas facultativas.

Tabla 1. Aparición de microorganismos patógenos en la ganadería porcina.

Patógeno	Incidencia única (nº de casos)	Incidencia mixta (nº de casos)	Incidencia total (nº de casos)	Frecuencia de incidencia (%)
<i>B. pilosicoli</i>	21	23	44	39
<i>Brachyspira</i> atípica	7	2	9	8
<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>	6	3	9	8
<i>L. intracellularis</i>	3	10	13	12
<i>Salmonella</i> spp.	4	8	12	11
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	4	13	17	15
<i>E. coli</i>	1	5	6	5
<i>Clostridium perfringens</i>	0	2	2	2

Un factor significativo en el mecanismo de acción de los quelatos orgánicos es que son capaces de inhibir la proliferación de bacterias patógenas en los intestinos, permitiendo por lo tanto el predominio de miembros útiles de la flora intestinal normal. Los inventores han estudiado varios tipos de compuestos de O-quelato y/o N-quelato de mono-, di-, bis-glicinato, metionato, lisinato, malato, propionato, estearato, valerianato, butilato de oligoelementos para examinar sus efectos sobre la proliferación de bacterias/hongos. En el curso de la determinación del valor de CIM para los quelatos de oligoelementos individuales, los inventores seleccionaron la combinación más óptima con beneficios económicos, y la investigación continuó enfocada en cómo la interacción de los quelatos afecta sus propiedades biológicas. Además, una cuestión básica de la administración de oligoelementos es cómo evitar la interacción de los iones metálicos con los demás componentes de la flora intestinal antes de la absorción, y esto puede conseguirse proporcionando una formulación actualmente bajo protección de patente.

Los oligoelementos, como el hierro, el cobre, el cinc, desempeñan un papel principal en el metabolismo de los microorganismos aeróbicos estrictos y facultativos, pero están presentes en el medio ambiente en cantidades mínimas. El bajo nivel de disponibilidad de hierro en las plantas se debe principalmente a la baja solubilidad de los polímeros de oxihidróxido férrico. En las partes de la planta bien oxidadas, la solubilidad de, p. ej., el hierro depende principalmente del  $Fe(OH)_3$ . La constante de solubilidad de estos compuestos es muy baja, ( $K_{sol} = 10^{-38}$ ), por lo tanto, la concentración de  $Fe^{3+}$  a pH 7 es  $10^{-17}$ , mientras que la concentración mínima para permitir el crecimiento normal de la planta es  $10^{-6}$  M [Neilands *et al.* (1987)]. Es la estrategia de adquisición de oligoelementos de la flora microbiana del microambiente dado la responsable de resolver la contradicción anterior. En dichos entornos, la mayoría de estas especies pueden vivir o "dominar" que tienen un mecanismo de adquisición de hierro y/o de adquisición de oligoelemento bien construido y muy eficaz. Las plantas utilizan la ayuda de microorganismos para estos fines.

Los microorganismos pueden usar tres mecanismos principales para disolver el oligoelemento insoluble y/o, p. ej., los óxidos de Fe (III): protonación, reducción y formación de quelatos. La protonación provoca el aumento de la disociación de, p. ej., los complejos de  $Fe(OH)_3$  al cambiar la constante de equilibrio (una unidad de disminución en el pH da como resultado un aumento de mil veces en la solubilidad de los iones de Fe (III)). Es obvio que esto solo puede usarse con algunas limitaciones en la naturaleza. La conversión de Fe (III) en Fe (II) del mismo pH da como resultado una solubilidad significativamente mayor. Sin embargo, este proceso tiene etapas con altas demandas de energía.

La formación de quelatos, que prevalece en el mundo real, tiene lugar con la ayuda de los llamados sideróforos, producidos principalmente por microorganismos. En el caso de que el oligoelemento esté menos disponible en el ambiente de los microorganismos, muchos organismos comienzan a producir metabolitos de bajo peso molecular, sideróforos y proteínas de membrana parcialmente externas que son características de la especie y tienen una alta afinidad para, por ejemplo,  $\text{Fe}^{3+}$ -ion (las proteínas de la membrana externa desempeñan un papel en el reconocimiento del complejo Fe-sideróforo y la absorción de hierro [Weger *et al.* (1986)], estos componentes disuelven los oligoelementos de los minerales y compuestos orgánicos (como la transferrina, lactoferrina). Los sideróforos son moléculas de ligandos de pequeño peso molecular, específicas de la especie que se unen principalmente mediante el átomo de oxígeno al ion Fe (III) con seis enlaces en direcciones octaédricas, y toman los iones  $\text{Fe}^{3+}$  del medio en forma de quelatos y los transportan en la célula microbiana [Neilands, J. B. (1981), Leong, J. (1986)]. En el transporte de los oligoelementos al citosol de la célula interviene un receptor de membrana específico, así como un sistema de transporte que reconoce los complejos hierro-sideróforo. Por lo tanto la producción de sideróforos de microorganismos en el intestino delgado con medio ligeramente ácido, neutro o alcalino es un fenómeno importante y genérico que es necesario para su capacidad de proliferación.

Los profesionales con experiencia en alimentación saben por experiencia que los animales alimentados con piensos que carecen de oligoelementos (Zn, Cu, Fe, Mn, etc.) se enferman más fácilmente de enfermedades gastrointestinales. La enfermedad no puede eliminarse por la administración de oligoelementos, pero la incidencia de enfermedades de origen digestivo es menor con un suministro equilibrado de oligoelementos.

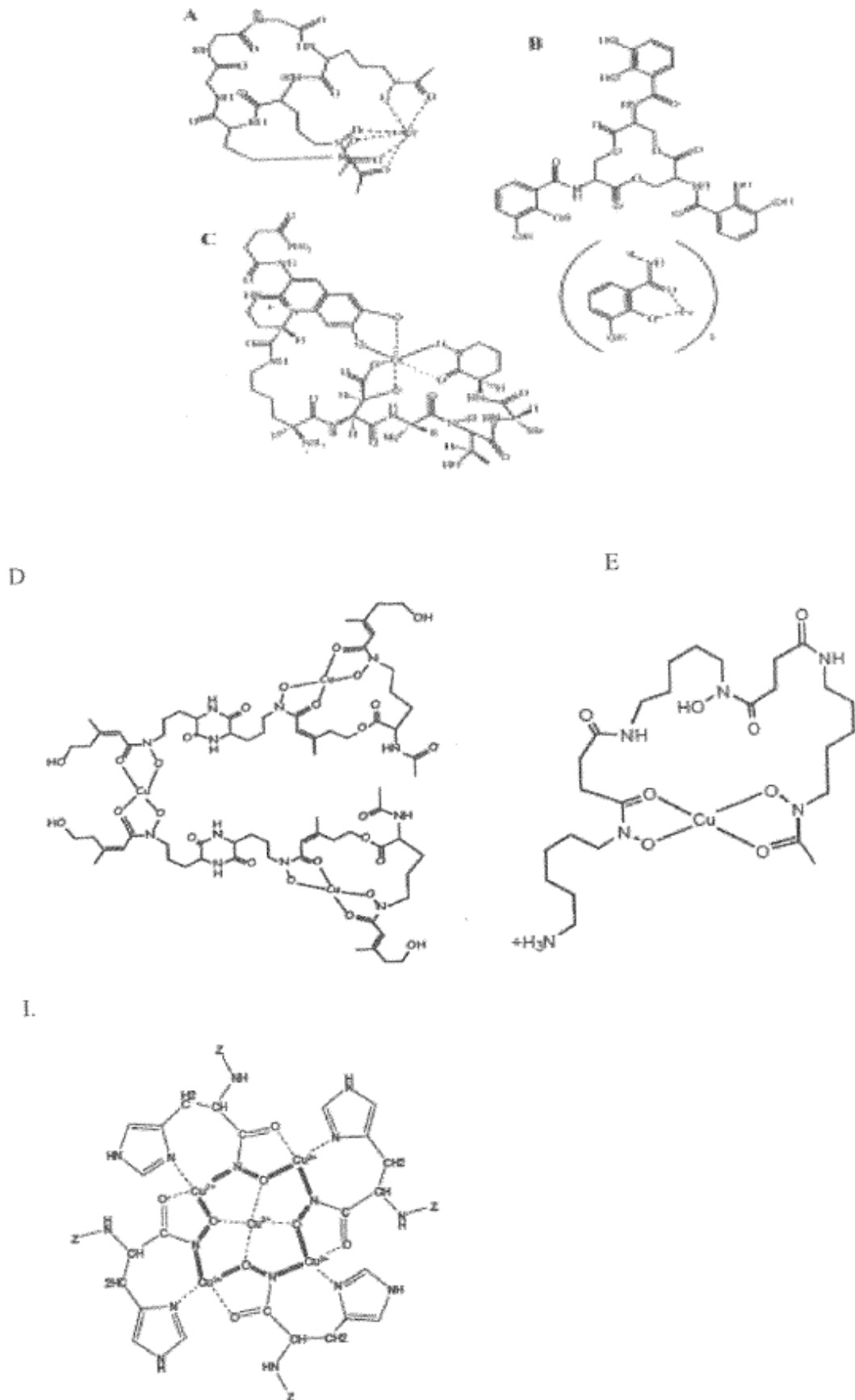
Los componentes de la flora intestinal normal están presentes en cantidades significativas, aproximadamente  $10^9$ - $10^{10}$  UFC/ml en el intestino delgado. Estas son, en la mayoría de los casos, las especies beneficiosas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* que producen principalmente ácido láctico y proporcionan un pH ligeramente ácido, por lo tanto no necesitan producir sideróforos. Los llamados microorganismos patógenos, p. ej., *E. coli*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Brachyspira* están presentes en la flora intestinal sana como máximo en una cantidad de  $10^5$  UFC/ml.

Según la bibliografía reciente, el equilibrio entre los microorganismos patógenos y no patógenos en el sistema gastrointestinal se atribuyó al pH. Existe una base real para esta hipótesis, ya que los lactobacilos se propagan en el intervalo del pH ácido y producen ácidos, tales como el ácido láctico. Los microorganismos patógenos se propagan en el intervalo neutro o ligeramente alcalino, donde los miembros de la flora intestinal normal no son capaces de reproducirse. Este descubrimiento sobre el pH es la base para el uso durante décadas de composiciones que contienen probióticos, lactobacilos en la cría de ganado. Cabe señalar que el resultado de este tratamiento es variado, en algunos casos es sorprendentemente eficaz y en otros es completamente ineficaz.

Los inventores pretenden proporcionar una posibilidad sorprendente completamente nueva en comparación con el estado actual de la técnica para el tratamiento de problemas del aparato digestivo. Los quelatos de oligoelementos, debido a su estructura específica, tienen mejores propiedades de absorción y utilización y son sorprendentemente capaces de inhibir la propagación de microorganismos patógenos facultativos. El espectro de los compuestos útiles para el tratamiento es amplio. En el caso de los probióticos, se utilizan varios microorganismos diferentes y la composición de los microorganismos utilizados varía según el efecto esperado. Se utilizan diferentes microorganismos en el caso de las aves y otros para la cría de cerdos. Según el descubrimiento actual de los inventores, esto está totalmente justificado, ya que la composición de los microorganismos patógenos que causan problemas en el caso de las aves es diferente de la de los cerdos.

La teoría de los inventores es que los llamados ligandos formadores de quelatos sideróforos desempeñan un papel importante en la formación de la microflora normal y los microorganismos patógenos, que proporcionan una ventaja en el entorno ligeramente alcalino o neutro del intestino delgado para las bacterias patógenas "hambrientas" de iones metálicos que producen sideróforo. Por lo tanto, cuando los quelatos de oligoelementos según la invención se unen sorprendentemente a los receptores de membrana que se unen a sideróforos bacterianos, las bacterias patógenas no tendrán la ventaja con su absorción de oligoelementos y, por lo tanto, su propagación.

La composición de la flora intestinal en el intestino grueso es completamente diferente de la del intestino delgado. En lugar de la flora intestinal dominada, p. ej., por *Lactobacillus*, tiene una flora intestinal dominada, por ejemplo, por *Clostridium*, es decir, tiene una flora intestinal dominada por patógenos. Sin embargo, se sabe que la absorción del oligoelemento se produce en el segmento posterior del intestino delgado. Sobre esta base, los inventores también afirman que los factores que forman el quelato sideróforo que son compuestos complejos que contienen oligoelemento u oligoelementos, proporcionan una ventaja exclusiva para las bacterias que producen estos ligandos sideróforos en el intestino grueso con inflamación crónica, este es un estado clínico frecuente en aves. Se deduce del descubrimiento anterior que los compuestos de oligoelementos se deben encontrar que puedan inhibir los microorganismos patógenos que producen sideróforos presentes en el aparato digestivo y que están compuestos de una combinación de oligoelementos y compuestos orgánicos. Además, si el efecto para saturar el receptor sideróforo que contiene el oligoelemento es real, entonces se necesita investigar compuestos en el intestino delgado que tengan área capaz de inhibir la propagación de microorganismos patógenos en baja concentración a la vez que afectan a los *Enterococcus* no patógenos pero que producen sideróforos que forman la flora intestinal normal solo en concentraciones más altas.



Estructura de sideróforos: tipos A, B y C de sideróforos de Fe y tipos D, E e I de sideróforos de cobre.



Un efecto adicional es que el ligando orgánico de tipo sideróforo quelante con oligoelemento se acopla con una molécula de antibiótico que inhibe la reproducción o la síntesis celular, por lo que la bacteria patógena lo absorbe con sus receptores sideróforos. Por lo tanto, se puede lograr un inhibidor más eficaz y/o un efecto letal con el antibiótico acoplado al quelato orgánico que con el compuesto antibiótico solo.

5 Otro efecto es que mediante la comunicación entre las células bacterianas, autoinducción (QS), las bacterias son capaces de sincronizar sus funciones genéticas y producir determinados compuestos cuando proliferan en grandes cantidades. Esto ocurre cuando las bacterias alcanzan una cantidad las así denominadas colonizan y forman una capa, "biofilme", por ejemplo, en la superficie del intestino o en un área de una herida. Esto también puede ocurrir cuando, si están en número suficiente en la sangre, alcanzando los puntos más lejanos del organismo atacado. El aumento de la concentración de las moléculas con señal QS segregadas es una señal para que las bacterias comiencen la proliferación intensiva. Las moléculas QS son principalmente ácidos grasos de cadena larga, quinoles, ésteres metílicos de ácidos grasos, compuestos de N-acil-homoserina, y de manera similar a los sideróforos, se unen a receptores específicos de las bacterias. Según la hipótesis de los inventores, estos receptores, al igual que los sideróforos, pueden estar saturados específicamente por los compuestos orgánicos de quelato de oligoelemento, por lo que las moléculas de señal QS no pueden ejercer sus efectos. Esto evita la comunicación entre las bacterias y, por lo tanto, su proliferación, colonización y formación de biofilmes.

En los experimentos de los inventores se estudian compuestos principalmente de Zn, Cu, Mn y Fe como oligoelementos en enlaces orgánicos. Los inventores determinan que los glicinatos de oligoelementos conocidos, los metionatos de oligoelementos, los malonatos de oligoelementos, etc., ya utilizados en la industria de piensos como una fuente de oligoelementos más eficaz tienen un efecto inhibidor selectivo sobre determinados microorganismos patógenos. La selectividad y la actividad biológica pueden mejorarse mediante la combinación de quelatos con oligoelementos quelatos con O y quelatos con N. Se consiguió una actividad biológica selectiva con aminoácidos, tales como metionina, lisina, glicina, etc., ácidos monovalentes, tales como ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico, ácido isobutírico, etc., hidroxiaácidos, tales como ácido láctico, etc., ácidos dicarboxílicos, ácido maleico, ácidos policarboxílicos. Con las sales de Zn, Cu, Mn y Fe de los anteriores. Asombrosamente, la actividad biológica aumenta significativamente en el caso de la formación de un O-quelato, tal como una molécula de agua, o un N-quelato, tal como con una de amoniaco.

Los oligoelementos mencionados se denominan por tanto compuestos formadores de quelatos, por lo que los inventores amplían sus estudios para los compuestos de quelatos con N y con O de los oligoelementos anteriores que tienen el efecto biológico.

Además, los inventores preparan compuestos de quelatos que, además de la formación de quelatos de N y O descritos anteriormente, contienen 0-6 moléculas de amoniaco o 0-6 moléculas de agua en enlaces de quelato con el ion metálico central.

Los quelatos de glicinato del oligoelemento pueden ser especialmente similares a la estructura de los sideróforos y, por lo tanto, al unirse al receptor de sideróforo de la célula, se puede evitar el oligoelemento, como la utilización de hierro de los microorganismos y, por lo tanto, la célula muere. Por lo tanto, el complejo de quelato de glicinato de hierro, cinc, cobre, manganeso debido a su estructura es capaz de cubrir el receptor de membrana de la célula bacteriana, preferiblemente con su afinidad específica por el receptor de membrana específico de la especie de la célula bacteriana dada influye directamente en el aporte de oligoelemento y, por consiguiente, en la viabilidad, reproducción y, por lo tanto, preferiblemente la muerte de la célula. El efecto depende de la sensibilidad del receptor de la especie, cepas de la bacteria dada, por lo tanto, determinadas especies o cepas pueden ser insensibles, por consiguiente puede decirse que el efecto de los quelatos de oligoelemento es específico para la especie, y requiere una medición microbiológica por separado de cada grupo bacteriano para conseguir el efecto CIM correctamente y/o preferiblemente el efecto CID.

Según algunos estudios, el quelato de oligoelementos desarrollado, p. ej., el glicinato, inhibió completamente la proliferación de microorganismos Gram positivos incluso en presencia de sangre. Su efecto inhibidor sobre la proliferación de cepas de *Pseudomonas* fue más débil, y el efecto fue más fuerte en otros microorganismos Gram negativos, así como en algunos hongos. Los estudios realizados hasta el momento con los diferentes extractos de quelato de oligoelemento demostraron claramente su eficacia en los más diversos microorganismos patógenos y dañinos de los alimentos. Según estos estudios, su actividad en las bacterias Gram positivas es mayor que en las Gram negativas, mientras que en otras composiciones, los inventores también encuentran un efecto pronunciado contra las Gram negativas en condiciones *in vitro*.

En el caso de enteritidis necrótica de aves (pollos de engorde, gallinas ponedoras, pavos) y disentería porcina aguda, el número de enterococos y lactobacilos disminuye significativamente en la flora intestinal y, al mismo tiempo, aumenta el número de fusobacterias, bacterias del género *Bacteroides*, *E. coli* y determinadas bacterias coliformes, así como *Clostridium*s. En casos de larga duración, se observa un aumento de clostridia. Debido a todo esto, los estudios de los inventores se realizaron en esta dirección: según nuestras pruebas en cultivo líquido y difusión en agar-agar, el quelato de glicinato de oligoelemento inhibe parcial o completamente el crecimiento de cepas de *Micrococcus luteus*, *E. coli*, *Salmonella enteritidis* y *Clostridium perfringens*. Las concentraciones mínimas inhibitoras o destructoras (CIM y CID) se miden en ensayos biológicos y se determinan para cada cepa.

Al combinarlos con compuestos de quelato de aminorato de cobre y cinc los inventores pudieron mejorar la capacidad de inhibición bacteriana. La proporción óptima de mezclas de quelatos de oligoelementos se determina en ensayos biológicos de difusión en agar-agar y cultivo líquido. Al estudiar el efecto de los complejos de quelatos metálicos desde un punto de vista microbiológico, los inventores observan que cuando se administran en determinadas concentraciones, son eficaces en el crecimiento de algunos de los microorganismos patógenos, mientras que en la misma concentración la reproducción de la población de microbios que forman la flora intestinal normal está indemne. Se pueden medir diferentes efectos antimicrobianos cuando se usan diferentes iones metálicos para la preparación de diferentes compuestos de quelatos metálicos. Los iones Zn, Cu, Fe, Mn utilizados para preparar el complejo ejercen su efecto sobre los microbios en diferentes concentraciones, incluso cuando los inventores usan el mismo ligando durante la formación del complejo. Durante los experimentos, los inventores han encontrado que los quelatos de oligoelementos glicinato de Zn y Cu en combinación *in vitro* son útiles para la prevención de enfermedades entéricas causadas por la *S. enterica* examinada en doble combinación sinérgica, y para la *C. perfringens* examinada en triple combinación sinérgica, mientras actúa selectivamente sobre la flora intestinal normal (p. ej., *Lactobacilli*, *Saccharomyces*) evita la proliferación de microbios patógenos facultativos y no inhibe las bacterias y levadura del ácido láctico que forman la flora intestinal normal. Los patógenos *Clostridium barati*, *Cl. sordellii*, *Cl. botulinum A - F*, *Cl. novy A, B, C, D*, *Cl. septicum*, *Cl. chuvoei*, *Cl. hystoliticum*, *C. sporogenes*, *Cl. tetani* que causan principalmente enfermedades superficiales son igualmente sensibles al quelato orgánico de cobre y cinc, preferiblemente compuestos de quelato aminorado.

Por supuesto, los compuestos según la invención son igualmente adecuados en aplicaciones humanas para la inhibición del crecimiento de las respectivas bacterias patógenas facultativas y para mantener los elementos beneficiosos de la flora intestinal, así como para el tratamiento y la prevención de enfermedades causadas por dichas bacterias patógenas.

#### Descripción de las figuras

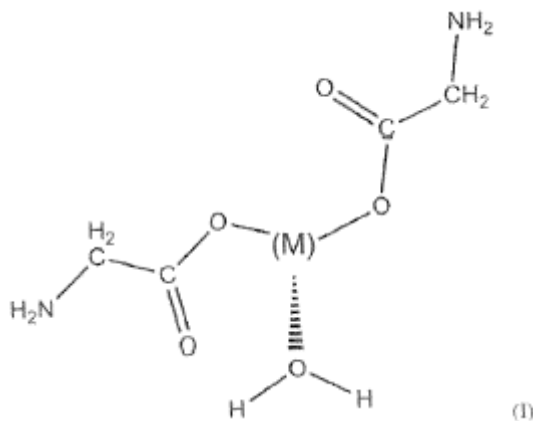
Figura 1. Espectro IR de quelato de monoglicinato de cinc.

Figura 2. Espectro IR del quelato de monoglicinato de cobre.

Figura 3. *Clostridium perfringens* forma una zona de inhibición en medio agar-agar TSA.

Ejemplo 1 - Preparación de quelato de bisglicinato de cinc

A 1 mol de ZnO (79,5 g), se añaden 200 ml de agua destilada, 2,1 mol de NH<sub>4</sub>OH, y 48,5 g de CO<sub>2</sub>. El producto de reacción es Zn(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 120°C y 10-12 bar de presión, después de 4 horas de tiempo de reacción. El pH del compuesto de quelato obtenido se ajusta con CO<sub>2</sub> a un valor de 8,0. En este momento, se forma un precipitado de ZnCO<sub>3</sub>. El precipitado obtenido se filtra, luego se hace reaccionar con 2 mol de glicina. De esta manera, se forma el siguiente compuesto con estructura (I):



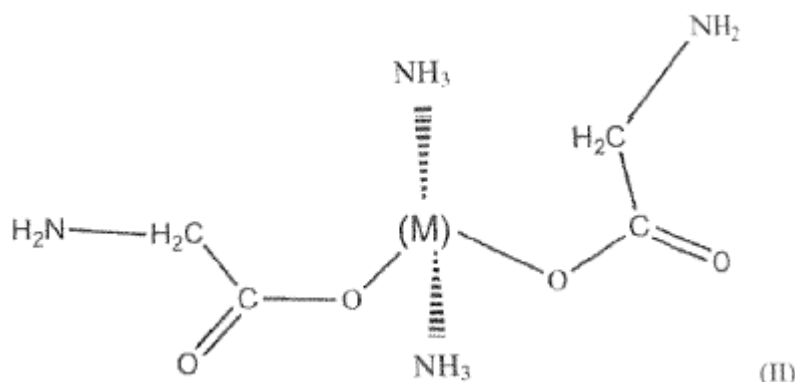
(M)(H<sub>2</sub>O)(Glicina)<sub>2</sub>, en donde M es Zn o Cu. Un ejemplo preferido del compuesto de fórmula es Zn(H<sub>2</sub>O)(Glicina)<sub>2</sub>.

La etapa de secado para la preparación del compuesto se lleva a cabo preferiblemente para mantener el contenido de agua del compuesto de quelato de oligoelementos reteniendo el contenido de agua apropiado. En el caso de que el producto se seque hasta un contenido de agua de 12-14%, se obtiene una formulación en polvo del compuesto de fórmula (I). Si el producto se secó casi a cero, hasta aproximadamente un 3% de contenido de agua, pierde entonces su contenido de agua conectado al átomo central del metal por el enlace coordinado. La actividad biológica de este último producto es diferente, será significativamente menor que la del compuesto de fórmula (I). El producto es un compuesto espeso, higroscópico y viscoso que tiene una alta solubilidad en agua.

Ejemplo 2 - Preparación de quelato de diamin-bisglicinato de cinc

A 1 mol de ZnO (79,5 g), se añaden 150 ml de agua destilada, 2,2 mol NH<sub>4</sub>OH y 48,5 g de CO<sub>2</sub>. El producto de reacción es Zn(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub> CO<sub>3</sub> a 120°C y una presión de 10-12 bar, después de 4 horas de tiempo de reacción. El

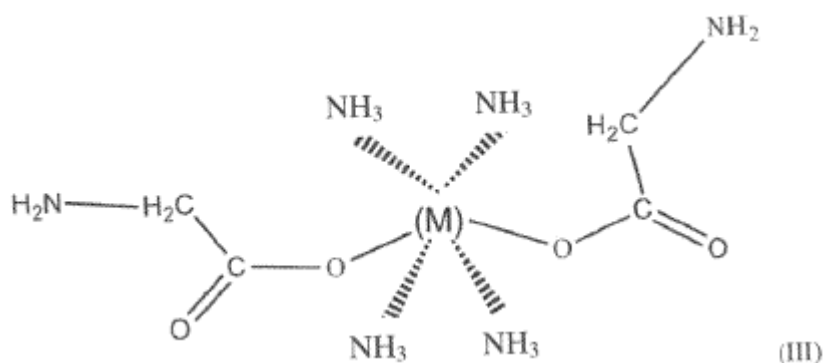
compuesto quelato obtenido se hace reaccionar directamente con 2 moles de glicina. Se obtiene el siguiente compuesto con estructura (II):



5 (M)(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(glicina)<sub>2</sub>, en donde M es Zn o Cu. La glicina puede sustituirse por cualquier aminoácido, por ejemplo, metionina, lisina, ácido aspártico, etc. Un compuesto preferido según la fórmula (II) es Zn (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(glicina)<sub>2</sub>.

Ejemplo 3 - Preparación de quelato de tetraamin-bisglicinato de cinc

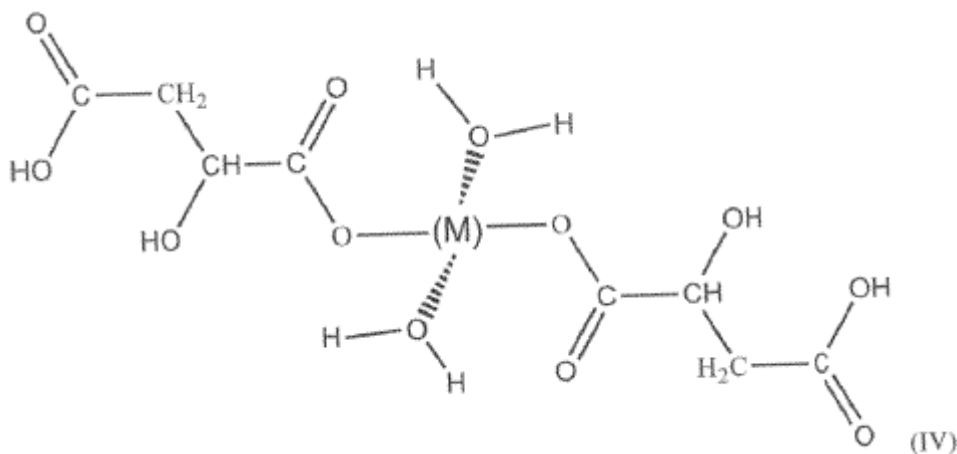
10 A 1 mol ZnO (79,5 g), se añaden 100 ml de agua destilada, 4,2 mol NH<sub>4</sub>OH, y 48,5 g de CO<sub>2</sub>. El producto de reacción es Zn(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub> CO<sub>3</sub> a 120°C y una presión de 10-12 bares, después de 4 horas de tiempo de reacción. El compuesto quelato obtenido se hace reaccionar directamente con 2 moles de glicina. Se obtiene el siguiente compuesto con estructura (III):



(M)(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(glicina)<sub>2</sub>, en donde M es Zn, Cu o Fe. La glicina se puede sustituir por cualquier aminoácido, por ejemplo, metionina, lisina, ácido aspártico, etc. Un compuesto preferido según la fórmula (III) Zn(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>(glicina)<sub>2</sub>.

Ejemplo 4 - Preparación de quelato malato de cinc

15 Al ZnCO<sub>3</sub> compuesto preparado como se describe en el ejemplo 1, se añade 2,0 mol de ácido málico en solución acuosa. Se obtiene el siguiente compuesto con estructura (IV):

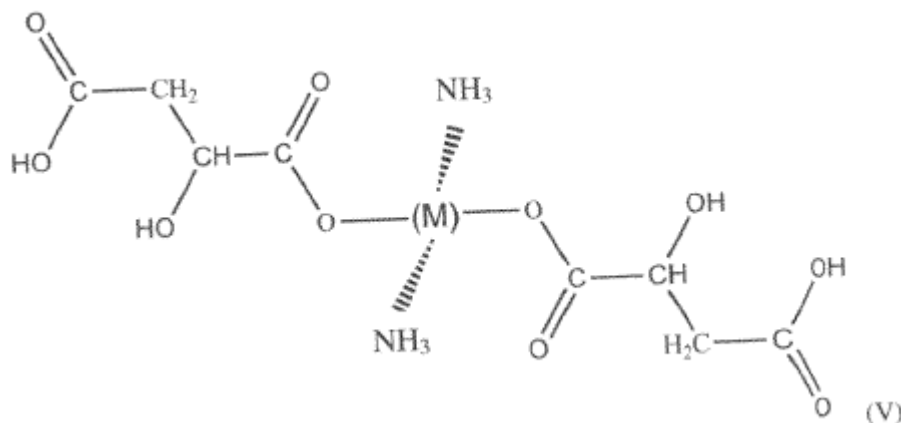


malato de Zn. El ácido maleico puede sustituirse por cualquier hidroxiaácido, por ejemplo ácido glicólico, ácido láctico, ácido hidroxibutírico, ácido cítrico, etc. El cinc puede sustituirse por otro oligoelemento, por ejemplo, cobre, etc.

La etapa de secado para la preparación del compuesto se lleva a cabo preferiblemente para mantener el contenido de agua del compuesto de quelato de oligoelementos al retener el contenido de agua apropiado. En el caso en que el producto se seca hasta un contenido de agua de 10-12%, se obtiene una formulación en polvo del compuesto de fórmula (IV). Si el producto se seca hasta casi a cero, hasta aproximadamente un 3% de contenido de agua, entonces pierde su contenido de agua conectado al átomo central del metal por enlace coordinado. La actividad biológica de este último producto es diferente, será significativamente menor que la del compuesto de fórmula (IV).

#### Ejemplo 5 - Preparación de quelato de diamin-malato de cinc

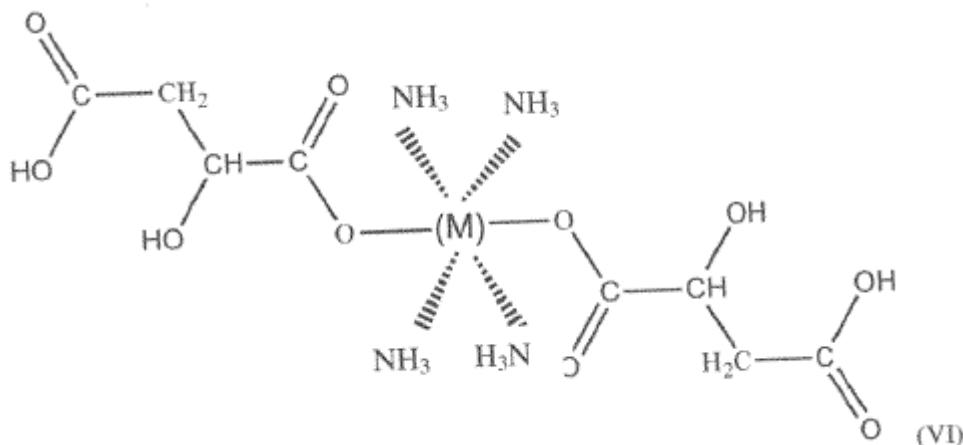
Al compuesto de  $Zn(NH_3)_2CO_3$  preparado como se describe en el ejemplo 2, se añaden 2,0 mol de ácido málico en solución acuosa. Se obtiene el siguiente compuesto:



diamin-malato de Zn. El ácido málico puede ser sustituido por cualquier hidroácido, por ejemplo ácido glicólico, ácido láctico, ácido hidroxibutírico, ácido cítrico, etc. El cinc puede ser sustituido por otro oligoelemento, por ejemplo, cobre, etc.

#### Ejemplo 6 - Preparación de quelato tetraamin-malato de cinc

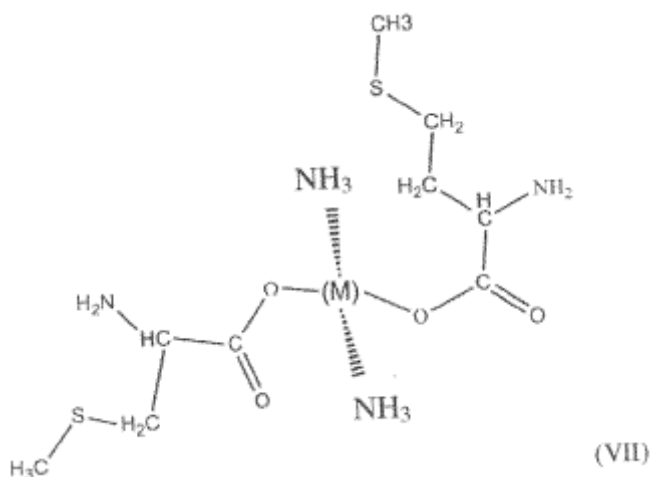
Al compuesto de  $Zn(NH_3)_4CO_3$  preparado como se describe en el ejemplo 3, se añaden 2,0 mol de ácido málico en solución acuosa. Se obtiene el siguiente compuesto con estructura (VI):



Tetraamin-malato de Zn. El ácido málico puede sustituirse por cualquier ácido hidroxílico, por ejemplo ácido glicólico, ácido láctico, ácido hidroxibutírico, ácido cítrico, etc. El cinc puede sustituirse por otro oligoelemento, por ejemplo, cobre, etc.

#### Ejemplo 7 - Preparación de quelato diamin-metionato de cinc

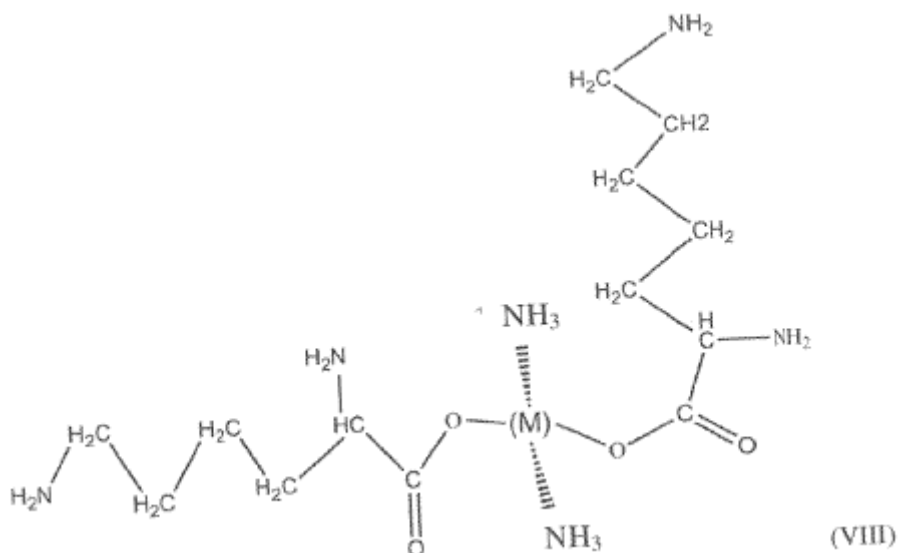
Al compuesto de  $Zn(NH_3)_2CO_3$  preparado como se describe en el ejemplo 2, se agregan 2 mol de metionina en solución acuosa.



Diamin-metionato de Zn.

Ejemplo 8 - Preparación del quelato diamin-lisinato de cinc

A 1 mol del compuesto de  $Zn(NH_3)_2CO_3$  preparado como se describe en el ejemplo 2, se añaden 2 mol de lisina.



5

Diamin-lisinato de Zn.

Ejemplo 9 - Preparación del quelato aminato de oligoelemento

A 1 mol del compuesto  $ZnCO_3$  o  $CuCO_3$  preparado como se describe en el ejemplo 1, se añade 2 moles de aminoácido de elección. El compuesto obtenido es quelato  $Zn(\text{aminato})_2$ .

10

En el caso cuando el producto se seca hasta un contenido de agua de 12-14%, a continuación se forma  $Zn(H_2O)(\text{aminato})_2$ . Si el producto se seca casi a cero, aproximadamente un 3% de contenido de agua, entonces pierde su contenido de agua conectado al átomo central de metal por enlace coordinado. La actividad biológica de este último producto es diferente, será significativamente menor que la del compuesto  $Zn(H_2O)(\text{aminato})_2$ .

Ejemplo 10 - Preparación del quelato de oligoelemento diamina

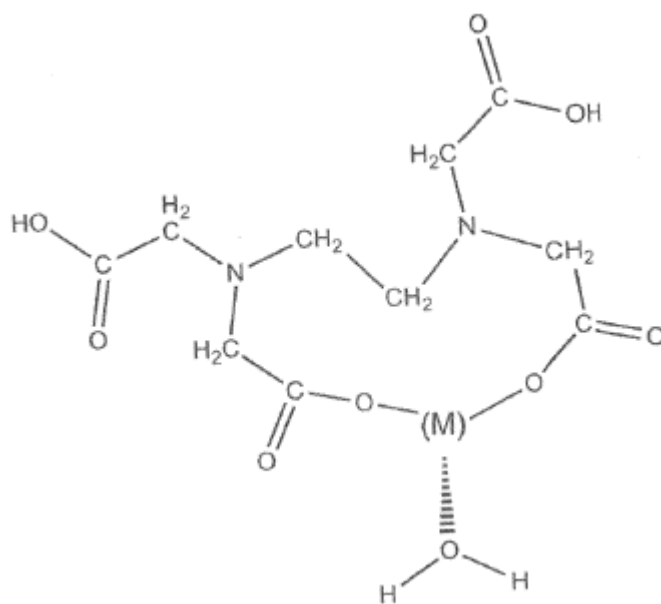
15

A 1 mol del compuesto  $Zn(NH_3)_2CO_3$  preparado como se describe en el ejemplo 2, se agregan 2 mol de aminoácidos de elección. El compuesto obtenido es Zn quelato de de diamin-aminato.

Ejemplo 11- Preparación del quelato EDTA de oligoelemento

20

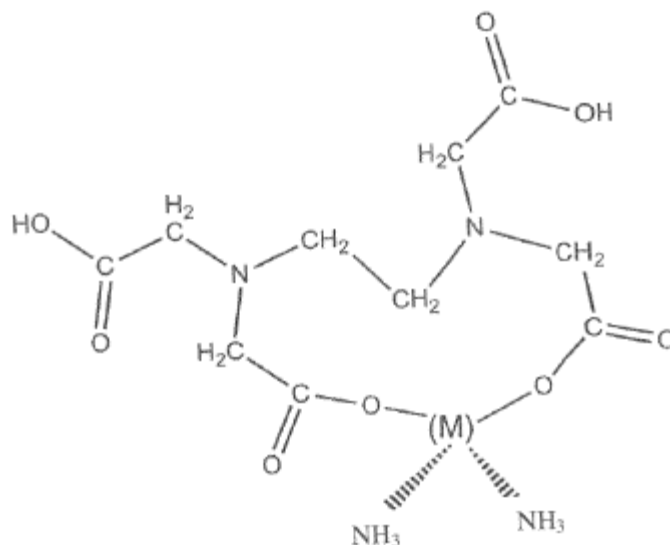
A 1 mol del compuesto de  $Zn(CO_3)$  preparado como se describe en el ejemplo 1, se agrega 1 mol de EDTA en solución acuosa. Una vez completada la reacción, el producto final, preferiblemente aplicado sobre un vehículo, se seca hasta un contenido de agua del 10%, para obtener el compuesto O-quelato siguiente.



## Ejemplo 12 - Preparación del quelato diamin-EDTA oligoelemento

Un mol del compuesto de  $Zn(NH_3)_2CO_3$  preparado como se describe en el ejemplo 2 se hace reaccionar con 1 mol de EDTA, para obtener el siguiente compuesto. El cinc se puede sustituir con cobre, hierro o manganeso como oligoelemento formador de quelante.

5



## Ejemplo 13 - Preparación de quelato de monoglicinato de cinc a escala industrial (ejemplo de referencia)

Los inventores realizaron la preparación de un quelato en reactores de 8.000 litros y de esta manera produjeron el quelato de oligoelemento. A 4.000 litros de agua, se agregaron 2.875 kg de sulfato de cinc heptahidratado y 750 kg de glicina. Después de reaccionar durante 4 horas a  $90^\circ C$ , se forma un producto de monoglicinato de cinc, que se convirtió en un microgranulado en un secador de lecho fluido, obteniendo así el producto.

10

La formación de enlaces de quelato en el producto obtenido se verificó mediante técnicas de determinación de la estructura (análisis complexométrico de iones metálicos, experimentos de calefacción, valoración ácido-base, registro de espectros de IR central) y por registro de los espectros de IR lejano del producto obtenido. La Fig. 1 muestra el espectro IR del quelato de monoglicinato de cinc.

15

Evaluación del espectro IR:

2000-4000  $cm^{-1}$ :

Aparecen dos bandas distintas con un máximo de banda de 3.160-3.211  $cm^{-1}$  y 3.456-3.390  $cm^{-1}$ , respectivamente. En el caso de las últimas bandas, hay un hombro en el intervalo del número de onda más alto. La banda anterior se puede asignar a las vibraciones de valencia de NH del grupo  $NH_3^+$  (según el espectro de glicina, glicina HCl). La(s)

20

última(s) banda(s) pueden asignarse a las moléculas de agua coordinadas. La presencia del "hombro" indica que hay moléculas de agua unidas con fuerzas variables (p. ej., coordinadas y no coordinadas, unidas solo por puentes de hidrógeno).

Bandas a 1600, 1400  $\text{cm}^{-1}$  y su proximidad:

5 En ambos casos, se puede observar un máximo de banda aguda e intensa (1643, 1643, 1649, 1652, 1651  $\text{cm}^{-1}$ ) y (1412, 1411, 1410, 1409, 1410  $\text{cm}^{-1}$ ), respectivamente. Esto indica que el grupo carboxilato de la glicina está coordinado en cada caso. Las diferencias de los respectivos máximos de banda (231, 222, 239, 243, 241  $\text{cm}^{-1}$ ) indican una coordinación bidentada, es decir, ambos oxígenos están coordinados. Se puede suponer un enlace de tipo puente, como se sugirió en el caso de los complejos de  $\text{Cu}(\text{glicina})\text{SO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Zn}(\text{glicina})\text{SO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , según los  
10 datos de difracción de rayos X [3].

1500  $\text{cm}^{-1}$  y su proximidad:

En cada muestra, se puede observar una banda de intensidad media con un máximo de alrededor de 1500  $\text{cm}^{-1}$  (1492, 1480, 1478, 1478, 1476  $\text{cm}^{-1}$ ), que indica claramente la presencia de glicina( $\text{NH}_3^+$ ) protonada según con lo que se observa en el intervalo de 2000-4000  $\text{cm}^{-1}$ .

15 1100 y 600  $\text{cm}^{-1}$ , y su proximidad:

En cada muestra, se pueden observar bandas intensivas cerca de los números de onda 1100 y 600  $\text{cm}^{-1}$  (1100, 1081, 1108, 1113, 1113, 1114 y 631, 617, 618, 618, 617  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente). Al mismo tiempo, se puede observar un hombro en el intervalo del número de onda más alto, lo que indica que el ion sulfato está coordinado al ion metálico como un ion y/o de manera monodentada (con un solo oxígeno).

20 En lugar de glicina, puede estar presente cualquier otro aminoácido, tal como metionina, lisina, ácido aspártico, etc. El cinc puede sustituirse por otro oligoelemento, por ejemplo, cobre, manganeso, etc.

Ejemplo 14 - Preparación de quelato de monoglicinato de cobre a escala industrial

A 1,8 metros cúbicos de agua, se agregaron 375 kg de glicina a 60-70°C. A esta solución, se agregan 1.250 kg de  $\text{CuSO}_4$  cristalino mientras se calienta a 80°C, luego se enfría durante 30 minutos. El producto de reacción se seca en un microgranulado en un secador de lecho fluido.  
25

La coordinación de Cu-quelato-glicina del producto industrial es claramente visible en el espectro IR. La molécula de glicina se coordina mediante el grupo carboxílico, y el grupo amino permanece protonado. El grupo carboxilato se coordina como un puente bidentado. Dos tipos de moléculas de glicina son visibles según se coordinan en diferentes ambientes. La glicina se coordina mediante el grupo carboxílico, como un ligando de puente bidentado. El grupo amino de la glicina permanece protonado. El ion sulfato se coordina de manera monodentada y/o bidentada. La Fig. 2 muestra el espectro IR del quelato mono-glicinato de cobre.  
30

2000-4000  $\text{cm}^{-1}$ : el máximo de banda es visible en los números de onda 3138 y 3192  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente, con varios máximos menores en el intervalo del número de onda inferior.

1600, 1400  $\text{cm}^{-1}$  y su proximidad: 2 de cada máximos de banda son visibles, valores de número de onda 1647, 1580 (en ambos casos) y 1458, 1410 y 1463, 1409  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente.  
35

1500  $\text{cm}^{-1}$  y su proximidad: hay una banda de intensidad media visible a un valor de 1512 y 1502  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente.

1100 y 600  $\text{cm}^{-1}$  y su proximidad: hay 3 y 2 máximos banda que son visibles, respectivamente, con hombros.

40 Conclusión: el grupo carboxílico de la glicina está coordinado, el grupo amino está protonado. El ion sulfato se une al ion cobre de manera bidentada.

Ejemplo 15 - Preparación de una mezcla de quelato de monoglicinato de cinc y cobre

Se mezclan 1.000 litros del quelato monoglicina de Zn preparado en el ejemplo 11 con 250 litros del quelato monoglicina de Cu preparado en el ejemplo 12 a 60°C en un reactor mezclador de cuchillas, a continuación la mezcla así obtenida se seca en un microgranulado en secador de lecho fluidizado.

45 Ejemplo 16 - Determinación de las concentraciones de CIM y CID de los compuestos de quelatos de oligoelementos en microorganismos patógenos facultativos y en componentes normales de la flora entérica

Los métodos convencionales para estudiar la actividad antimicrobiana, desde un punto de vista médico curativo, el espectro de resistencia del agente antimicrobiano, son los ensayos de difusión de discos o los ensayos de difusión en pozos de agar-agar y los experimentos de dilución realizados en cultivos líquidos. En un ensayo normalizado de difusión de discos u orificios (NCCLS, DIN, etc.), se estudian los efectos de un agente antimicrobiano sobre el crecimiento de un microorganismo de prueba extendido sobre la superficie de una placa de cultivo de agar-agar. En un ensayo de difusión en agar-agar, p. ej., se prepara un césped bacteriano en la placa de agar-agar, luego, según el procedimiento desarrollado en el laboratorio, las placas inoculadas se perforan en el medio con un dispositivo de corte de disco de agar-agar. Luego, se colocan 10-100  $\mu\text{l}$  de muestra de ensayo en el orificio. El compuesto de prueba se difunde desde el disco de prueba colocado en el césped bacteriano o desde un orificio hecho en la placa  
55

de agar-agar en el medio de cultivo, y por lo tanto forma una zona de inhibición del crecimiento-propagación alrededor del disco u orificio. Basándose en la prueba de difusión en agar-agar, se puede determinar inequívocamente la sensibilidad de la cepa estudiada frente a los compuestos de prueba. Según la práctica clínica, de manera similar a los ensayos normalizados de agentes antibióticos (donde el diámetro de la zona es proporcional a la concentración del agente), los inventores clasifican según las zonas de sensibilidad formadas alrededor de los orificios del disco. En el caso de cada uno de los agentes, los microorganismos se clasifican como resistentes o sensibles al agente dado en función del diámetro de la zona. El uso de nuevos agentes antimicrobianos requiere un alto nivel de precaución. A saber, es sabido que influye la difusión del agente antimicrobiano (en el ensayo de difusión en agar-agar), como el pH del medio, la concentración de O<sub>2</sub> o CO<sub>2</sub> disuelto, interacciones con los componentes del medio), por lo tanto, deben seleccionarse las técnicas apropiadas y los medios adecuados tanto para el agente dado como para los microorganismos en función de múltiples factores. Se prepararon concentraciones adecuadas de los microorganismos en cultivos líquidos en pruebas de dilución de cultivos, y se comprobó al microscopio y/o por técnicas ópticas la evolución del crecimiento y la propagación. Esta prueba permite la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) del agente de interés en un microorganismo dado. Además, en el caso de que también se compruebe la muerte de los microorganismos dentro de los tubos que no muestran crecimiento, para determinar si el agente tiene solo un efecto estático (inhibidor de crecimiento) o un cid (es decir, que tiene actividad para matar microbios), entonces también puede determinarse la concentración cid mínima (MCC). La relación de MCC/CIM proporciona una información esencial en la eficacia *in vivo* del agente: si este valor es alto, la utilidad *in vivo* del agente es probablemente baja.

Tabla 2. Cepas examinadas en el estudio:

Cepas patógenas:	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Enterica</i> serovar <i>enteritidis</i> (SALMO)
Cepas patógenas facultativas:	<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 (COLI)
	<i>Micrococcus luteus</i> NCAIM B 01072 (MCC)
	<i>Brachyspira hyodysenteriae</i> (capa propia, B/06)
	<i>Staphylococcus aureus</i> NCAIM B.01065 <sup>T</sup>
	<i>Streptococcus agalactiae</i> NCAIM B.01882 <sup>T</sup>
	<i>Clostridium perfringens</i> NCAIM B.01417 <sup>T</sup>
Componentes de la flora entérica normal, productores de ácido láctico	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> NCAIM B 02070 <sup>T</sup>
	<i>Lactobacillus casei</i> v. <i>Rhamnosus</i> Döderlein LCR 35
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (PRODUCTORES DE ACIDO LACTICO)
Hongos:	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (LSE)

Hasta su uso en los ensayos, las cepas se almacenaron en suspensión en caldo TSB (Scharlau Microbiology) con glicerol estéril al 25% congelado a -80°C o liofilizado.

#### Aislamiento de la cepa de *B. hyodysenteriae* (B/06)

Se aislaron cepas de *B. hyodysenteriae* del cultivo y cerdos reservados que mostraban los síntomas clínicos de la disentería porcina, criados en diferentes regiones de Hungría. Después del sacrificio en el matadero, las trampas de colon de los cerdos que presentaban signos clínicos se ataron y se transportaron al laboratorio en seis horas. Después de abrir las secciones de colon, se proporcionó la muestra como raspado de la mucosa de colon. En todos los casos, los raspados de la mucosa en un sembrador en estrías se extendieron sobre la superficie de agar-agar con TSA (triptonona-soja) recién preparado (Scharlau Microbiology) enriquecido con 10% de sangre bovina desfibrinada y 400 µg/ml de espectinomicina (Sigma-Aldrich Kft.). Después de la inoculación, los cultivos se incubaron durante 96 horas a 42°C en condiciones estrictamente anaeróbicas. Las condiciones anaeróbicas se lograron utilizando bolsas generadoras de gas anaeróbico (Oxoid, Gas Generating Kit, Anaerobic System BR0038B) y vasos de cultivo anaerobios (Oxoid Anaerobic jar). La determinación de las propiedades bioquímicas primarias y secundarias y la identificación de las cepas aisladas se llevó a cabo mediante técnicas normalizadas (Quinn *et al.*, 1994).

#### Experimentos de inhibición *in vitro*

Adición de una cantidad dada (ppm, mg/kg, µg/ml) de oligoelemento al medio de cultivo microbiano de la solución madre. Las soluciones de muestra con composiciones variables se diluyeron 2 veces en serie en medio de cultivo líquido en una placa de cultivo hístico Greiner de 24 pocillos, a continuación se midieron 5 µl de suspensión de la bacteria de muestra en densidad de 0,5 MacFarland preparada con solución salina fisiológica en los medios de cultivo líquidos de diferente concentración. En el caso de ensayar combinaciones de principios activos, se utilizó una



técnica de dilución cruzada, cuando las dos soluciones diferentes se diluyeron a través de la superficie de la placa en dos direcciones. Las placas se incubaron durante 24 horas en las condiciones atmosféricas requeridas por la bacteria analizada. A continuación se leyeron los resultados y se determinó la concentración inhibidora mínima (CIM) de los compuestos de ensayo. En los casos en los que se analizó la concentración letal mínima (CID), después en los pocillos que no presentan opacidad después del periodo de incubación, se inocularon 10 µl de solución en la superficie de agar-agar con sangre y se comprobó si aparecía algún cultivo bacteriano en la superficie del medio de cultivo después del periodo de incubación.

Difusión en gel de agar-agar

*Clostridium perfringens* : La cepa cultivada en un recipiente aeróbico o anaeróbico se propagó sobre agar-agar estéril, a partir de la cual se preparó una suspensión con una densidad de 0,5 MacFarland con solución salina fisiológica estéril, luego se inoculó en la superficie de los medios de cultivo con hisopos de algodón. Se perforó un orificio en medio inoculado con una herramienta de perforación especializada, luego se midieron en los orificios 50 µl de la solución de prueba del complejo de quelato de oligoelemento. La evaluación de los cultivos se realizó por inspección visual. La presencia de una zona de inhibición formada alrededor de los orificios es indicativa de la eficacia de la solución probada.

*B. hyodysenteriae* (B/06): En estos ensayos, se prepararon precultivos a partir de la masa bacteriana descongelada en agar-agar con sangre (triptona soja agar-agar modificado, enriquecido con 5-10% de sangre bovina desfibrinada). A partir de las placas de agar-agar de pre-cultivo visualmente bien hemolizadas, 8-10, se escindieron inoculaciones en bloque de agar-agar de casi el mismo tamaño ( $\pm$  5% de diferencia), luego se extendieron en placas de agar-agar recién preparadas de 90 mm de diámetro con una varilla de vidrio estéril con extremo redondeado aproximadamente 5 mm de diámetro. Las placas se secaron en forma cubierta durante 5 minutos.

Según el procedimiento desarrollado en el laboratorio, las placas inoculadas se perforaron en el medio con un dispositivo de corte de disco de agar-agar. Se colocaron en el agujero de 5 mm de diámetro 100 µl de la dilución dada del compuesto de ensayo. Después de gotear la solución con una concentración conocida, las placas se colocaron en un anaerostato (bolsa y vaso anaeróbico Oxoid) en 15 minutos, y se incubaron a 37°C durante 4-5 días en una atmósfera sin oxígeno.

El cultivo bacteriano de *Clostridium perfringens* es inhibido por el quelato orgánico de oligoelemento colocado en el orificio en el centro de la placa de agar-agar. El compuesto difundido en el agar-agar forma una zona de inhibición de forma concéntrica y bien definida que depende de la concentración, y debido al efecto de la dilución, el efecto inhibidor cesa después de una determinada distancia y el cultivo muestra un crecimiento más allá de la zona de inhibición (véase la Fig. 3).

Determinación del valor CID

Es la concentración del principio activo que causa la muerte completa de los microbios. En condiciones estériles dentro de una caja laminar, se preparó una serie de dilución a partir de los medios de cultivo líquidos que se incubaron durante 24 horas, después de la serie de dilución se colocaron 100 µl en placas de agar-agar y se extendió con una varilla de vidrio estéril. El periodo de incubación es de 24 horas en condiciones favorables para el crecimiento del microbio, luego se cuenta el número de colonias en las placas de agar-agar.

Para la evaluación se tomaron en consideración dos opciones.

1. No se ven colonias en las placas de agar-agar.

2. Hay colonias visibles en las placas de agar-agar que hacen posible el recuento.

En el caso en el que no haya colonias visibles en el medio de cultivo después de la incubación, esto indica el efecto destructor de microbios (CID) del quelato del oligoelemento. El número de colonias contables que crecen en las placas de agar-agar da el valor CIM real del quelato del oligoelemento dado.

Ejemplo 17 - Resultados microbiológicos de CIM y CID de compuestos de quelato de oligoelemento (cinc, cobre, hierro, manganeso) (mono, di y bisaminato, ácido graso e hidroxido ácido graso, ácido poliaminocarboxílico)

El sistema de ensayo microbiológico mostró actividad biológica a diferentes concentraciones con las muestras de complejo de quelato de oligoelemento estudiadas.

Se puede ver en los resultados de los experimentos realizados que las muestras de ensayo tienen diferentes valores de CIM. Los patógenos y patógenos facultativos examinados tienen sensibilidad significativamente mayor que la de los componentes de la flora intestinal normal, los hongos y los productores de ácido láctico. Se puede concluir de los resultados *in vitro* que la mezcla de estos compuestos de prueba en el pienso sería preventiva, evita el crecimiento de patógenos y patógenos facultativos, además de mantener el equilibrio. Se determinó que los compuestos de quelatos estudiados tienen diferentes valores de CIM.

TABLA 3. Concentración inhibidora mínima (CIM) de los compuestos quelatos de oligoelementos en ppm (mg/kg).

ES 2 703 611 T3

Quelatos ensayados	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella enterica</i>	PRODUCTORES DE ÁCIDO LÁCTICO	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Monoglicinato de cinc *	60	100	100	800	800
Diglicinato de cinc *	60	100	120	800	800
Bisglicinato de cinc *	440	360	320	800	800
Bisglicinato de cinc (H <sub>2</sub> O) *	60	120	220	800	500
Monoglicinato de cobre *	200	400	400	800	800
Diglicinato de cobre *	200	340	450	800	800
Bisglicinato de cobre *	280	500	600	800	800
Bis-glicinato de cobre (H <sub>2</sub> O)	60	300	400	800	800
Monoglicinato de hierro *	100	350	450	1.000	1.000
Monoglicinato de manganeso *	100	300	300	1.000	1.000
Diamin-bismalato de Zn	N/A	80	120	500	500
Bismalato de Zn *	N/A	280	360	600	600
Bismalato de Zn(H <sub>2</sub> O)	N/A	90	120	500	600
Diamin-bismalato Cu	N/A	262	262	N/A	N/A
Diamin-bisglicinato Zn	N/A	115	115	N/A	N/A
Tetraamin-bisglicinato de Zn	N/A	140	140	N/A	N/A
Bisalaninato de Zn(H <sub>2</sub> O)	N/A	100	110	N/A	N/A
Bispropionato Zn(H <sub>2</sub> O)	N/A	160	160	N/A	N/A
Bisvalerianato Zn(H <sub>2</sub> O)	N/A	120	120	N/A	N/A
Bisbutirato Zn(H <sub>2</sub> O)	N/A	110	110	N/A	N/A
Bis-salicilato Zn *	n.a.	> 4.000	> 4.000	n.v.	n.a.
Bisbenzoato Zn *	n.a.	> 4.000	> 4.000	n.v.	n.a.
Nitrolotriacetato Zn *	n.a.	40	40	n.v.	n.a.
Bismalato Cu(H <sub>2</sub> O)	n.a.	120	210	n.a.	n.a.
Diamin-aspartato Zn	n.a.	92	184	n.a.	n.a.
Diamin-bisaspártato Zn	n.a.	123	247	n.a.	n.a.
Diamin-triaspartato Zn	n.a.	114	228	n.a.	n.a.
Monoaspartato Zn	n.a.	74	74	n.a.	n.a.
Bisaspártato Zn(H <sub>2</sub> O)	n.a.	103	103	n.a.	n.a.
Triaspártato Zn(H <sub>2</sub> O)	n.a.	75	70	n.a.	n.a.
Diamin-glutamato Zn	n.a.	167	83	n.a.	n.a.
Diamin- bisglutamato Zn	n.a.	123	123	n.a.	n.a.
Diamin-triglutamato Zn	n.a.	117	117	n.a.	n.a.
Monoglutamato Zn *	n.a.	70	115	n.a.	n.a.
Bisglutamato Zn(H <sub>2</sub> O)	n.a.	82	82	n.a.	n.a.
Tri glutamato Zn(H <sub>2</sub> O)	n.a.	70	280	n.a.	n.a.
Diamin-bishistidinato Zn	n.a.	> 4.000	> 4.000	n.a.	n.a.
Bishistidinato Zn *	n.a.	> 4.000	> 4.000	n.a.	n.a.
Diamin-asparaginato Cu	n.a.	620	620	n.a.	n.a.
Diamin-bisasparginato Cu	n.a.	1.025	2.050	n.a.	n.a.
Diamin-triasparaginato Cu	n.a.	1.400	> 4.000	n.a.	n.a.
Diamin-glutamato Cu	n.a.	688	343	n.a.	n.a.
Diamin-bisglutamato Cu	n.a.	775	775	n.a.	n.a.
Diamin-triglutamato Cu	n.a.	1.950	1.950	n.a.	n.a.
Diamin-citrato Zn	n.a.	48	98	n.a.	n.a.
	<i>Staphylococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Brachyspira</i>	<i>Arcanobacterium</i>

ES 2 703 611 T3

	<i>aureus</i>	<i>agalactiae</i>	<i>perfringens</i>	<i>hyodysenteriae</i>	<i>piogenes</i>
Diamin-bismalato Zn	80	20	340	2.315	21
Bismalato Zn(H <sub>2</sub> O)	160	180	360	4400	n.a.
Bismalato Cu(H <sub>2</sub> O)	N/A	N/A	50	88	n.a.
Diamin(malato) <sub>2</sub> Cu	262	131	65	143	n.a.
Monoglicinato de Cu *	n.a.	N/A	50	90	92
Diglicinato de Cu *	2	145	50	n.a.	n.a.
Bisglicinato de Cu *	110	420	360	320	260
Bisglicinato Cu(H <sub>2</sub> O)	5,3	171	100	96	32
Monoglicinato de cinc	40	80	210	> 4.000	n.a.
Ácido etilendiamin-tetraacético Zn	n.a.	n.a.	1.000	450	n.a.
Ácido etilendiamin-tetraacético Zn(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub>	n.a.	n.a.	400	320	n.a.
Ácido etilendiamin-tetraacético Cu(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub>	n.a.	n.a.	60	100	n.a.
Ácido nitrilotriacético Cu*	n.a.	n.a.	> 4.000	450	n.a.
Ácido etilendiamin-tetraacético Cu *	n.a.	n.a.	160	320	n.a.
Ácido diaminonitrilo triacético Zn *	n.a.	n.a.	400	600	n.a.
Ácido diamino-etilendiamintetraacético Zn	n.a.	n.a.	100	> 4000	n.a.
Ácido diaminonitrilo triacético Cu *	n.a.	n.a.	120	200	n.a.
Ácido diamino etilendiamintetraacético Cu	n.a.	n.a.	20	80	n.a.
Bisalaninato Zn(H <sub>2</sub> O)	n.v.	n.v.	> 4.000	> 4.000	n.a.
Bis-salicilato Zn *	n.v.	n.v.	> 4.000	n.v.	n.a.
Bisbenzoato Zn *	n.v.	n.v.	> 4.000	n.v.	n.a.
Monoglicinato Zn *	20	40	210	> 4.000	n.a.
Diglicinato Zn *	20	20	165	> 4.000	n.a.
Bisglicinato Zn(H <sub>2</sub> O)	4	29	180	> 4.000	n.a.
Bis-malato Cu(H <sub>2</sub> O)	n.a.	n.a.	50	88	n.a.
Diamin-asparaginato Zn	46	23	369	n.a.	n.a.
Diamin-bis-asparaginato Zn	62	15	494	n.a.	n.a.
Diamin-tri-asparaginato Zn	114	14	456	n.a.	n.a.
Asparaginato Zn *	18	37	297	n.a.	n.a.
Bis-asparaginato Zn *	26	51	412	n.a.	n.a.
Tri-asparaginato Zn *	18	19	450	n.a.	n.a.
Diamin-glutamato Zn	61	15	245	n.a.	n.a.
Diamin-bis-glutamato Zn	42	21	334	n.a.	n.a.
Triamin-tri-glutamato Zn	58	15	469	n.a.	n.v.
Glutamato Zn *	36	18	475	n.a.	n.a.
Bis-glutamato Zn(H <sub>2</sub> O)	21	10	331	n.a.	n.a.
Tri-glutamato Zn(H <sub>2</sub> O)	35	17	281	n.a.	n.a.
Diamin-bis-histidinato Zn	> 4.000	12	1.950	n.a.	n.a.
Bis-histidinato Zn *	> 4.000	4	650	n.a.	n.a.
Diamin-asparaginato Cu	620	20	38	n.a.	n.a.
Diamin-bis-asparaginato Cu	1.025	16	32	n.a.	n.a.
Diamin- tri-asparaginato Cu	1.400	43	44	n.a.	n.a.

Diamin-glutamato Cu	343	11	43	n.a.	n.a.
Diamin-bis-glutamato Cu	387	24	97	n.a.	n.a.
Diamin-tri-glutamato Cu	487	8	30	n.a.	n.a.
Diamin-citrato Zn	49	49	n.a.	n.a.	n.a.
Glicinato de Ag *	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	184

\* : compuestos de referencia

5 De los resultados anteriores se pueden sacar varias conclusiones. Luego se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los compuestos de quelato de oligoelementos estudiados para uno o más microorganismos patógenos facultativos. Se determinó que, sin excepción, todo era capaz de inhibir el microorganismo patógeno. En concentraciones de 60-200 ppm de *Micrococcus luteus*, y/o en concentraciones de 70-400 ppm de *Escherichia coli*, y/o en concentraciones de 80-488 ppm de *Salmonella enterica*, y/o en concentraciones de 40-498 ppm de *Staphylococcus aureus*, y/o en concentraciones de 10-427 ppm de *Streptococcus agalactiae*, y/o en concentraciones de 65-167 ppm de *Clostridium perfringens* y/o en concentraciones de 90-494 ppm de *Brachyspira hyodysenteriae*, y/o en concentraciones de 21-184 ppm se inhibió *Arcanobacterium piogenes*.

10 Los componentes de la flora intestinal normal, productores de ácido láctico *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, *Lactobacillus casei* v. *rharnosus* y *Leuconostoc mesenteroide* y/o *Saccharomyces cerevisiae* (LSE) solo se inhibieron en o por encima de una concentración de 500 ppm, y preferiblemente en concentraciones de 800-1000 ppm.

15 Ejemplo 18 - Doble examen sinérgico de quelatos de mono-glicinato de oligoelementos (cinc, cobre, hierro, manganeso). Estudios sinérgicos del componente oligoelemento

20 Existe una sinergia entre dos o más compuestos de prueba cuando sus efectos biológicos se ven reforzados por sus interacciones. Conociendo los valores de CIM y CID, se consideró importante garantizar la selectividad de los quelatos de oligoelementos. Para lograr este objetivo, se continuaron los experimentos con el estudio de los quelatos de oligoelementos juntos, en busca de sinergias.

Tabla 4. Composiciones sin mostrar sinergia y antagonismo

Valores de CIM sinérgicos dobles (ppm) de quelatos de oligoelementos					
Quelatos ensayados en doble sinergia	<i>Clostridium</i>	LSE y <i>Lactococcus</i>	Efecto inhibitor de <i>E. coli</i> entre si	Efecto inhibitor de <i>Salmonela</i> entre si	<i>Brachyspira hyodysenteriae</i>
Monoglicinato Zn : Cu	Zn 360: Cu 50	Zn 800 : Cu 800	-	-	Zn 43,7 : Cu 22
Monoglicinato Zn : Fe	Zn 350: Fe 1000	Zn 800 : Fe 1000	Zn 180: Fe 110	-	
Monoglicinato Fe : Mn	Fe 1000: Mn 500	Fe 1000 : Mn 1000	-	-	
Monoglicinato Zn : Mn	Zn 350 : Mn 500	Zn 800 : Mn 1.000	Zn 10 : Mn 1.940	Zn 10 : Mn 1940	
Monoglicinato Cu : Mn	Cu 100 : Mn 500	Cu 800 : Mn 1.000	-	-	
Monoglicinato Cu : Fe	Cu 100 : Fe 1000	Cu 800 : Mn 1.000	-	-	
Malato Zn - Monoglicinato Cu	Zn 90: Cu 23			Zn 90: Cu 23	

Tabla 5: Composiciones que muestran sinergia

Valores de CIM sinérgicos dobles (ppm) de quelatos de oligoelementos		
Quelatos ensayados en doble sinergia	<i>E. coli</i>	<i>Salmonela</i>
Monoglicinato Zn : Cu	Zn 90: Cu 50	Zn 90: Cu 50
Monoglicinato Zn : Fe		Zn 30: Fe 260
Monoglicinato Fe : Mn	Fe 250: Mn 240	Fe 230: Mn 240
Monoglicinato Zn : Mn		
Monoglicinato Cu : Mn	Cu 210: Mn 240	Cu 210: Mn 240
Monoglicinato Cu : Fe	Cu 50: Fe 230	Cu 50: Fe 230

5 Sobre la base de estos resultados, se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) del quelato de 6 oligoelementos para la *Salmonella enteritidis* patógena. Estas concentraciones de quelatos de oligoelementos prácticamente no tienen efecto sobre los componentes normales de la flora intestinal (LSE y *Lactococcus*) (800 ppm). Sin embargo, en el caso de la *E. coli* patógena facultativa, cinco composiciones diferentes de estos seis quelatos de oligoelementos tienen un valor CIM sinérgico efectivo.

10 Ejemplo 19 - Examen sinérgico múltiple de oligoelementos (cinc, cobre) y aniones (aminoácidos, ácidos orgánicos e hidroxiaácidos, etc.)

Además de lo que se mostró en el ejemplo 18, la sinergia no solo se encontró cuando se combinaron los oligoelementos, sino que también se reconocieron las sinergias cuando la parte aniónica de los compuestos, es decir, cuando se combinaron los aminoácidos, los ácidos (Tabla 5).

15 Se concluyó basándose en los datos de la tabla que existe una sinergia más allá de los compuestos básicos si los compuestos quelatos que consisten en diferentes metales se mezclan de manera óptima, así como las partes aniónicas se mezclan de manera óptima, y se puede obtener un efecto agregado si los quelatos que contienen ligandos NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O se mezclan.

Tabla 6. Composiciones que muestran sinergia sextuple

Sinergia de aminatos	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonela enteritidis</i>	<i>Estafilococcus aureus</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Clostridium Perfringens</i>
Aminato <sub>6</sub> Zn (gly <sub>2</sub> , asp <sub>2</sub> , glu <sub>2</sub> , his <sub>2</sub> , lys <sub>2</sub> , ala <sub>2</sub> )	195 ppm	97	49	97	390
Aminato <sub>6</sub> Zn(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (gly <sub>2</sub> , asp <sub>2</sub> , glu <sub>2</sub> , his <sub>2</sub> , lys <sub>2</sub> , ala <sub>2</sub> )	75	150	37	78	298
Aminato <sub>6</sub> Cu(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (gly <sub>2</sub> , asp <sub>2</sub> , glu <sub>2</sub> , his <sub>2</sub> , lys <sub>2</sub> , ala <sub>2</sub> )	29	117	15	30	117

Explicación:

20 El oligoelemento aniónico se quela con la sinergia la combinación séxtuple de amina carbonato de cinc aminatos de gly (glicina), asp (ácido aspártico), glu (ácido glutámico), his (histidina), lys (lisine) y ala (alanina) en concentraciones de 49-390 ppm, el quelato aniónico de oligoelemento y aminatos de cinc también en sinergia séxtuple en concentraciones 37-238 ppm y los aminatos de cobre y amonio en séxtuple sinergia en concentraciones de 15-117 ppm son útiles *in vitro* para prevenir las posibles enfermedades causadas por *E. coli* y *Salmonella enteritidis*,  
25 *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Clostridium perfringens* al interferir con la proliferación de los microbios patógenos facultativos.

Ejemplo 20 - Examen sinérgico múltiple de quelatos de monoglicinato de oligoelementos (cinc, cobre, hierro). Estudios sinérgicos del componente oligoelemento

30 Sabiendo que las sinergias dobles de los quelatos de oligoelementos dieron resultados de 50-80% en la proliferación de microbios, se llevaron a cabo más estudios de sinergia triple. Junto a los quelatos de oligoelementos en las sinergias dobles, se añadió un tercer quelato de oligoelementos. Para la determinación de la sinergia triple, se

utilizaron todos los métodos de ensayo, y los resultados finales obtenidos se muestran cuando los dos líquidos, así como el ensayo en microplaca dieron el mismo resultado.

Tabla 7. Composiciones sin mostrar triple sinergia

Valores sinérgicos triples de CIM (ppm) de quelatos de oligoelementos			
Variaciones triples de sinergia	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Clostridium</i>
	Mono-glicinato de Zn: Monoglicinato de Cu: Mono-glicinato de Fe		
1	Zn 20 : Cu 100 : Fe 20	Zn 90 : Cu 100 : Fe 60	-
2	Zn 90 : Cu 10 : Fe 40	Zn 20 : Cu 110 : Fe 140	-
3	Zn 10 : Cu 60 : Fe 260	-	-

5

Tabla 8. Composiciones que muestran triple sinergia

Valores sinérgicos triples de CIM (ppm) de quelatos de oligoelementos			
Variaciones triples de sinergia	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Clostridium</i>
	Mono-glicinato de Zn: Mono-glicinato de Cu: Glicinato de Fe		
1	-	-	Zn 40 : Cu 30 : Fe 70
2	-	-	Zn 40 : Cu 30 : Fe 20

Los quelatos de oligoelementos son útiles *in vitro* para la prevención de enfermedades entéricas causadas por la *E. coli* y *Salmonella* examinadas en una combinación sinérgica doble, y para los microbios de *Clostridium* examinados en una combinación sinérgica triple, al prohibir selectivamente la proliferación de microbios patógenos facultativos, aunque sin inhibir las bacterias del ácido láctico y las levaduras que forman la flora intestinal normal.

10

Ejemplo 21 - Determinación de las concentraciones cid eficaces o estáticas de los quelatos de monoglicinato de oligoelementos (cinc, cobre, hierro, manganeso)

La concentración letal mínima (CID) se determina como se describe en el ejemplo 14.

Tabla 9

COLI		SALMO		PRODUCTORES DE ÁCIDO LÁCTICO		LSE	
Fe 318 ppm	Zn 70	Fe 318 ppm	Zn 70	Fe 318 ppm	Zn 70	Fe 318 ppm	Zn 70
Cu 206	Mn 242	Cu 206	Mn 242	Cu 206	Mn 242	Cu 206	Mn 242
Cu 52	Zn 88	Cu 52	Zn 88	Cu 52	Zn 88	Cu 52	Zn 88

15

Valores de CIM sinérgicos dobles (ppm) de quelatos de oligoelementos

Quelatos de oligoelementos	<i>Salmonella</i>	<i>S. tiphy</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Lactococcus</i>	LSE
Monoglicinato de cinc	3.000	3.000	-	800	800
Monoglicinato de cobre	-	-	200	800	800

5 En el caso de las cepas de *Salmonella*, el valor CID del quelato de cinc es 30 veces más alto que el valor de CIM, mientras que en el caso de las cepas de *Clostridium*, el valor CID del quelato de cobre es solo el doble del valor de CIM. Esta diferencia también puede explicarse con la diferente sensibilidad de las especies de microbios. Sin embargo, debe considerarse en el caso de los componentes de la flora intestinal normal que ambos quelatos tienen la misma concentración para los valores de CIM y CID, los resultados son indicativos de que en el caso de los componentes de la flora intestinal normal, la proliferación del microbio no se inhibe en estas concentraciones, pero los microbios se destruyen.

Ejemplo 22 - Experimentos piloto de alimentación con una composición que contiene quelatos de ácido etilendiamintetraacético y cinc (H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> y ácido etilendiamintetraacético y cobre (H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> en combinación

10 La alimentación experimental se realizó con cerdos en crecimiento en dos ocasiones, en condiciones ambientales piloto en un caldo que lleva *Brachyspira hyodysenteriae*.

15 Los grupos de referencia y experimental estaban compuestos por 100 cerdos. El último grupo recibió la composición experimental, en la dosis de alimentación de 1 kg/Tm según lo determinado en las pruebas de laboratorio. En el primer estudio, el grupo de referencia recibió una dosis preventiva de un antibiótico en su alimentación (Tabla 10). En el segundo estudio, solo los cerdos que sufrían disentería fueron tratados individualmente (Tabla 11). Los parámetros estudiados: número de tratamientos, desarrollo de pérdidas, peso promedio del sacrificio y utilización del pienso.

Tabla 10. Efecto de la composición sobre el rendimiento y la salud de los cerdos (El grupo de referencia recibió tratamiento antibiótico preventivo)

Denominación	Grupo de referencia (antibiótico)	Grupo experimental
Número de animales	100	100
Peso promedio inicial (kg)	31,5	31,7
Muertos	0	0
Peso medio en matadero (kg)	109,5	112,3
Consumo de pienso (kg)	25 877	25 071
Utilización del pienso (kg/kg)	3,31	3,11

Tabla 11. Efecto sobre el rendimiento de los cerdos (El grupo de referencia recibió tratamiento antibiótico individual por inyección)

	Grupo de referencia (antibiótico)	Grupo experimental
Número de animales	100	100
Peso promedio inicial (kg)	28,4	28,1
Animales tratados por vía intramuscular	21	2
Muertos durante el experimento	0	0
Peso en el matadero (kg)	105,8	109,8
Utilización del pienso (kg/kg)	3,23	2,96

25 En el primer experimento, (Tabla 10), después del mismo tiempo de engorde, el peso en el matadero en el grupo experimental fue 2,8 kg más, es decir, 2,6% en promedio, en comparación con el grupo de referencia, y la cantidad de pienso necesaria para producir 1 kg de peso en vivo fue de 0,2 kg menos, lo que significa un aumento del 6% en la utilización del pienso.

En el segundo experimento (Tabla 11), el peso en el matadero fue 3,9% mayor en el grupo experimental, mientras que la utilización del pienso fue mejor por un valor de 9,1% en el grupo experimental que en el grupo de referencia.

30 Ejemplo 23 - Experimento piloto de alimentación con una composición que contiene bisglicinato de cobre (H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>

La alimentación experimental se realizó con cerdos en crecimiento, en condiciones ambientales piloto con los métodos de animales emparejados en un ganado infectado con el patógeno *Lawsonia intracellularis*. El grupo de

referencia recibió el complemento antibiótico habitual mezclado en el pienso. El pienso del grupo experimental se complementó con una composición de diamin-bis-glicinato de cobre en un vehículo, en un racionamiento de 1 kg/t.

Los parámetros estudiados: número de tratamientos, desarrollo de pérdidas, peso promedio en el matadero y utilización del pienso.

5 Tabla 12. Efecto del tratamiento sobre el rendimiento en experimentos de animales emparejados.

	Grupo experimental	Referencia
Número de animales	326	331
Días de engorde	101	101
Peso promedio inicial kg	30,86	33,74
Peso añadido kg	76,15	71,73
Peso promedio en el matadero kg	107,01	105,47
Utilización de pienso kg/kg	3,10	3,31

El peso en el matadero en el grupo experimental fue 1,6% mayor. El peso añadido en el grupo experimental fue 6,2% mayor. La utilización de pienso en el grupo experimental fue mejor en un valor de 6,8% en el grupo experimental que en el grupo de referencia.

10 Ejemplo 24 - Experimentos piloto con quelato de bis-glicinato de cobre y amoníaco en una granja que presenta los síntomas de enteritidis necrótica causada por la infección por *Clostridium perfringens*

Los experimentos se llevaron a cabo en dos graneros, con 17.100 pollitos ROSS-308 cada uno. La granja está plagada continuamente con la infección por *Clostridium perfringens*. Requiere tratamientos antibióticos en discontinuo.

15 El primer granero tenía los pollitos del grupo de referencia, mientras que el segundo granero tenía los pollitos del grupo experimental. El grupo de referencia no recibió complemento en su pienso. El grupo tenía en el granero experimental un pienso enriquecido con diamin-bis-glicinato de cobre aplicado sobre un vehículo en una dosis de 1,0 kg/t.

Los resultados se resumen en la Tabla 13.

20 Tabla 13. Efecto de la alimentación de la composición experimental sobre pollitos de engorde

Parámetro estudiado	Grupo de referencia	Grupo experimental	Diferencia
Días de raras	42	42	
Pollitos al inicio	17.100	17.100	25
Pollos enviados	16.242	16.238	4
Peso total en vivo, kg	31.005	32.395	1.390 (4,5%)
Ganancia de peso total, kg	30.298	31.681	1.383 (4,6%)
Uso total de pienso, kg	59.260	59.880	620
Peso medio en matadero, g	1.909	1.995 ***	86 (4,5%)
Utilización relativa del alimento kg/kg	1,96	1,89	3,6%

\*\*\* = la diferencia es significativa a  $P \leq 0,001$

35 El aumento de peso del grupo experimental superó al del grupo de referencia en un 4,6%, mientras que el pollo híbrido de carne experimental requirió un 3,6% menos de pienso para el aumento de peso en vivo por unidad.

Las caras de los animales en el grupo experimental estaban bien formadas, sin signos de un cambio que indicara que la diarrea fuera visible. La camada estaba algo más seca en este grupo, el nivel de amoníaco del aire era sensiblemente menor que el de la referencia.

No se observaron efectos secundarios adversos al alimentar con la composición experimental.

40 Ejemplo 25 - Efecto de la alimentación con ácido etilendiamintetraacético y amina de cobre en un grupo de gallinas ponedoras después de la exposición a *Clostridium perfringens*



En condiciones 108 de laboratorio, se colocaron gallinas ponedoras de 32 semanas de edad en jaulas, con una densidad de animales de 3 gallinas por jaula. Antes de ingresar a las aves en el experimento, se utilizaron hisopos cloacales para detectar el patógeno *Clostridium perfringens*. Se demostró que el grupo está moderadamente infectado por *Clostridium perfringens*.

5 Se formaron tres grupos iguales con las 108 aves con 36 gallinas cluecas en cada una.

1. Grupo I de referencia negativa, negativo a *C. perfringens*

2. Grupo II de referencia positiva, positivo a *C. perfringens*, inoculado por sonda gástrica con 2 ml de  $10^6$  CFU/ml de cultivo bacteriano de *C. perfringens*.

10 3. Grupo III de tratamiento enriquecido positivo a *C. perfringens*, inoculado con una sonda gástrica con 2 ml de  $10^6$  UFC/ml de cultivo bacteriano de *C. perfringens*.

Los resultados se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14 - Parámetros de rendimiento de las gallinas ponedoras expuestas a *C. perfringens*

Datos	Grupo I de referencia negativa	Grupo II de referencia positiva	Grupo III de tratamiento
Huevos en total (pc)	1.750	1.526	1.868
Nº de huevos/gallina	48,60	42,38	51,80
Peso total de huevos (kg)	114,07	103,99	125,70
Peso del huevo g/pc.	65,1 g	68,1 g	67,2 g

15 La producción de huevos disminuyó en más del 13% en el grupo de referencia positiva, en comparación con el grupo de referencia negativa, debido a la infección por *C. perfringens*. En respuesta al tratamiento, el rendimiento del huevo aumentó en un 6,7% en comparación con el grupo de referencia negativa y en un 22,4% en comparación con el grupo de referencia positiva. El peso total del huevo mostró una tendencia similar durante el experimento. Hubo una tendencia diferente en la medición de los huevos individuales, porque el peso de cada uno de los huevos fue el mayor en el grupo de referencia positiva.

20 Ejemplo 26 – Experimento de alimentación para evitar enfermedades diarreicas que aparecen en el destete al administrar malato de cinc ( $H_2O$ )<sub>2</sub>

Lechones destetados de 32 días de edad se alimentaron con un pienso enriquecido con maleinato de cinc y amonio. Los animales experimentales tenían infección por *E. coli*. El grupo de referencia recibió el complemento antibiótico habitual en el alimento para controlar la infección por *E. coli*.

25 Los rendimientos de la producción se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Parámetros de rendimiento de producción durante el experimento.

	Grupo de referencia	Grupo Experimental
Nº de animales	28	31
Peso inicial (kg)	9,11	9,19
Duración del experimento (días)	45	38
Morir durante el experimento	1	0
Peso corporal al final del experimento (kg)	21,26	24,05
Ganancia diaria de peso (g)	270	391
Utilización del pienso (kg/kg)	2,31	2,04

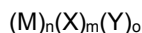
30 El aumento de peso diario promedio fue 45% mayor en el grupo experimental que en el grupo de referencia. La utilización de pienso fue un 13% mejor en el grupo experimental que en el grupo de referencia. No hubo ninguna muerte en el grupo experimental; sin embargo, en el grupo de referencia 1 animal (3,6%) murió durante el período experimental.

**Referencias**

- Chu, B. C, Garcia-Herrero, A., Johanson, T. H., Krewulak, K. D., Lau, C. K., Peacock, R. S., Slavinskaya, Z., Vogel, H. J.: Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view. *Biometals* (2010)23(4), 601-611.
- 5 Du, Z. (1994): Bioavailabilities of copper in copper proteinate, copper lysine and cupric sulfate, and copper tolerances of Holstein and Jersey cattle. Ph. D. Thesis, University of Kentucky, Lexington, KY.
- Kakukk Tibor, dr. Schmidt János, 1988. *Takarmányozás* 3.4:122-145
- Leong, J. (1986) Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 24: 187-209.
- 10 Mahan *et al.* (1994): Biotechnology in the feed industry: Proc. of Alltech's Tenth Annual Symposium. págs. 323-333
- Miethke y Marahiel, (2007) SIDEROPHORE-BASED IRON ACQUISITION AND PATHOGEN CONTROL, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71(3), 413-451
- Neilands, J. B. (1981) Microbial iron compounds *Annu. Rev. Biochem.*, 50: 715-731.
- 15 Neilands, J. B., Konopka, K., Schwyn, B., Coy, M., Francis, R. T., Paw, H., Bagg, A. (1987) Comparative biochemistry of microbial iron assimilation. En: Iron Transport in Microbes, Plants and Animals (Winkelmann, G, van der elm, D., Neilands, J. B. Eds.), (VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemania) págs. 3-33.
- Quinn P. J., Carter M. E., Markey B. K., Carter GR., 1994. Clinical Veterinary Microbiology. Wolfe Publishing, London
- Shi *et al.* (1995): Influence of iron oxide, iron sulfate and iron proteinate on Cu bioavailabilities from Cu sulfate and Cu proteinate. *J. Dairy Sci.* 78: 187 (Supl. 1).
- 20 Weger, L. A. de, Boxtel, R. van, Burg, B. van der, Gruters, R., Geels, F. P., Schippers, B., Lugtenberg, B. (1986) Siderophores and outer membrane proteins of antagonistic, plant-growth-stimulating, root-colonizing *Pseudomonas* spp. *J. Bacteriol.*, 165: 585-594.
- Whittaker *et al.* (1993) Regul. Toxicol. Pharmacol., 18(3), 419-27

## REIVINDICACIONES

1. Compuesto complejo de quelato orgánico con oligoelemento que tiene la fórmula general



en donde M es Zn, Cu, Fe, Mn, Ag;

5 X es NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O;

Y es un aminoácido (preferiblemente seleccionado del grupo consistente en los 20 aminoácidos naturales), un ácido graso preferiblemente ácido fórmico, ácido acético o ácido propiónico), hidroxiaácido (preferiblemente ácido maleico o ácido láctico) y/o ácido poliamino-carboxílico (preferiblemente ácido nitrilotriacético o ácido etilendiamintetraacético);

n es 1-6;

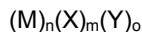
10 m es 1-6;

o es 1-8,

en donde el complejo se selecciona del grupo consistente en:

15 bisglicinato de cobre (H<sub>2</sub>O), bisglicinato de cobre (H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>, bismalato Cu (H<sub>2</sub>O), ácido etilendiamintetraacético Cu (H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>, bisglicinato de cinc (H<sub>2</sub>O), ácido etilendiamintetraacético Zn (H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>, malato Zn (H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>, bisalaninato Zn (H<sub>2</sub>O), bisaspartato Zn (H<sub>2</sub>O), bisbutirato Zn (H<sub>2</sub>O), bisglutamato Zn (H<sub>2</sub>O), bispropionato Zn (H<sub>2</sub>O), bisvalerianato Zn (H<sub>2</sub>O), bismalato Zn (H<sub>2</sub>O), bisglicinato de cobre (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, ácido etilendiamintetraacético de cobre (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, bismalato de cobre (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, asparaginato Cu (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, bisasparaginato Cu (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, bisglutamato Cu (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, glutamato Cu (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, bismalato de cinc (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, ácido etilendiamintetraacético de cinc (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, malato de cinc (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, metionato de cinc (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, bisglicinato de cinc (NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, malato de cinc (NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, asparaginato Zn (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, aspartato Zn (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, bisasparaginato Zn (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, bisaspartato Zn (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, bisglutamato Zn (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, bisglicinato Zn (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, bishistidinato Zn (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, citrato Zn (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, glutamato Zn (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

2. Compuesto complejo de quelato orgánico con oligoelemento, para su uso en el tratamiento de enfermedades causadas por bacterias patógenas, que tiene la fórmula general



25 en donde M es Zn, Cu, Fe, Mn, Ag;

X es NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O;

Y es un aminoácido (preferiblemente seleccionado del grupo consistente en los 20 aminoácidos naturales), un ácido graso preferiblemente ácido fórmico, ácido acético o ácido propiónico), hidroxiaácido (preferiblemente ácido maleico o ácido láctico) y/o ácido poliamino-carboxílico (preferiblemente ácido nitrilotriacético o ácido etilendiamintetraacético);

30 n es 1-6;

m es 1-6;

o es 1-8.

3. El compuesto complejo de quelato orgánico con oligoelemento, para su uso según la reivindicación 2, seleccionado del grupo consistente en:

35 bisglicinato de cobre (H<sub>2</sub>O), bisglicinato de cobre (H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>, bismalato Cu (H<sub>2</sub>O), ácido etilendiamintetraacético Cu (H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>, bisglicinato de cinc (H<sub>2</sub>O), ácido etilendiamintetraacético Zn (H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>, malato Zn (H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>, bisalaninato Zn (H<sub>2</sub>O), bisaspartato Zn (H<sub>2</sub>O), bisbutirato Zn (H<sub>2</sub>O), bisglutamato Zn (H<sub>2</sub>O), bispropionato Zn (H<sub>2</sub>O), bisvalerianato Zn (H<sub>2</sub>O), bismalato Zn (H<sub>2</sub>O), bisglicinato de cobre (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, ácido etilendiamintetraacético de cobre (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, bismalato de cobre (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, asparaginato Cu (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, bisasparaginato Cu (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, bisglutamato Cu (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, glutamato Cu (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, bismalato de cinc (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, ácido etilendiamintetraacético de cinc (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, malato de cinc (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, metionato de cinc (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, bisglicinato de cinc (NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, malato de cinc (NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, asparaginato Zn (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, aspartato Zn (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, bisasparaginato Zn (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, bisaspartato Zn (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, bisglutamato Zn (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, bisglicinato Zn (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, bishistidinato Zn (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, citrato Zn (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, glutamato Zn (NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

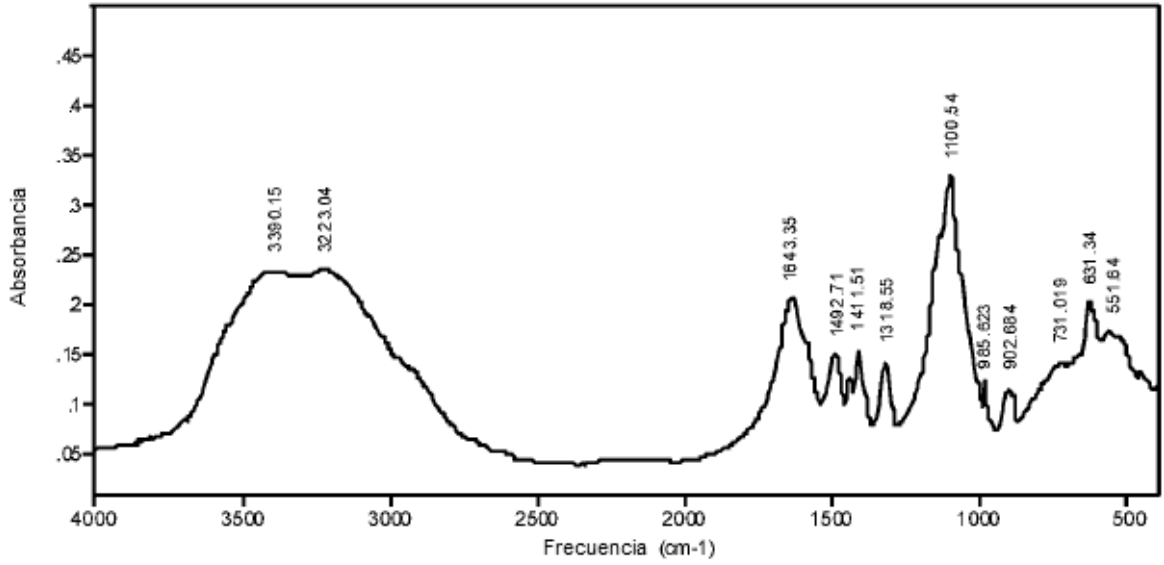
4. El compuesto para su uso según la reivindicación 2 o 3, en donde la bacteria patógena facultativa se selecciona del grupo consistente en: *Salmonella*, *E. coli*, *Clostridium* sp., *Brachyspira* sp., *Arcanobacterium* sp., *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Lawsonia* sp., *Eimerella* sp.

5. El compuesto para su uso según la reivindicación 2 a 4, en donde la bacteria patógena se selecciona del grupo consistente en: *Salmonella enterica*, *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar *enteritidis*, *Salmonella typhimurium*,

*Salmonella infantis*, *Salmonella gallinarum*, *S. paratyphi*, *S. abortus-equi*, *S. java*, *S. cholerae*, *S. typhi-suis*, *S. sendai*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium barati*, *Cl. sordellii*, *Cl. botulinum A-F*, *C. novyy A, B, C, D*, *Cl. septicum*, *Cl. Chuvoei*, *Cl. hystoliticum*, *C., sporogenes*, *Cl. tetani*, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli*, *Arcanobacterium piogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Lawsonia intracellularis*.

- 5 6. El compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, para el tratamiento o la prevención de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en: enfermedades entéricas de aves de corral, enfermedades entéricas porcinas, enfermedades entéricas bovinas, así como tratamientos superficiales, por ejemplo pododermatitis ulcerativa con dermatitis necrótica de aves de corral, mastitis del ganado lechero, metritis del ganado lechero, lesiones de pezuña de ungulados, enfermedades entéricas y superficiales de otros animales.
- 10 7. El compuesto para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, para la inhibición de bacterias que proliferan en la parte del intestino delgado del aparato digestivo o en la superficie de la piel y que producen enfermedades en las mismas, y/o para la prevención o tratamiento de enfermedades causadas por dichas bacterias.
8. Método para preparar un aditivo para piensos, comprendiendo dicho método la mezcla del compuesto según la reivindicación 1, y componentes del aditivo para piensos adicionales.
- 15 9. Método para preparar un pienso, comprendiendo dicho método mezclar el compuesto según la reivindicación 1 en el pienso habitual.
10. Uso del compuesto según la reivindicación 1 en la cría de ganado para aumentar el peso corporal y aumentar la utilización de pienso y aumentar el rendimiento en huevos y/o disminuir la mortalidad en la población de aves de corral, preferiblemente pollo para asar o gallinas cluecas o pavos, y/o cerdos, preferiblemente para engorde o
- 20 lechones y/o vacas lecheras.

Bio-Rad Win-IR

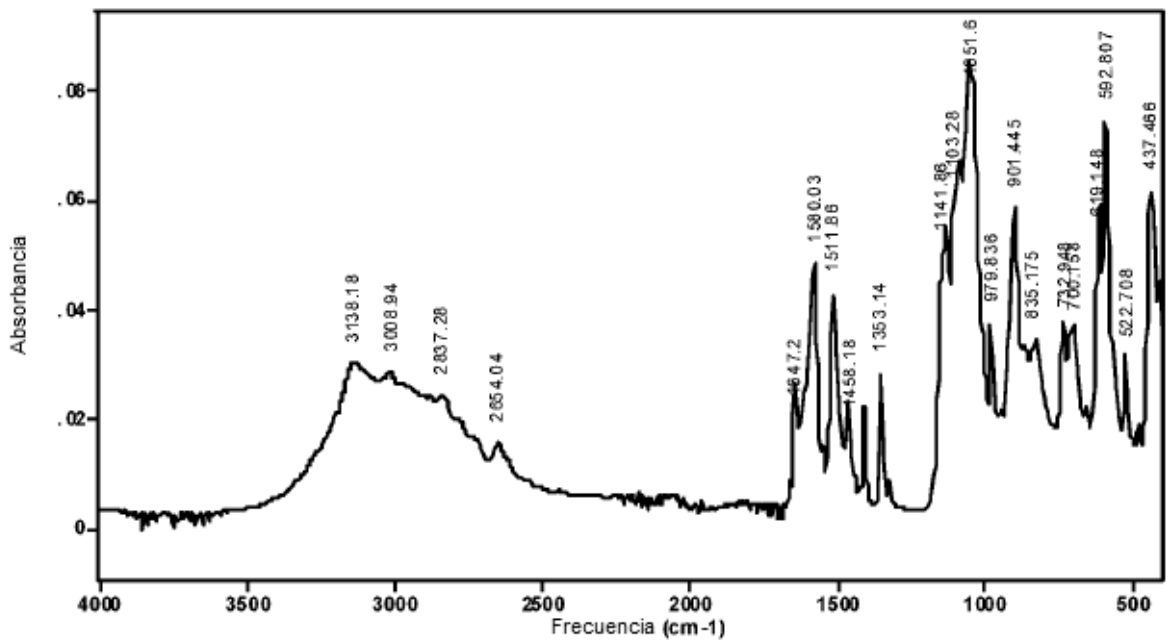


File #14 = MJ15835

View Mode: Peaks

Fig. 1

Bio-Rad Win-IR



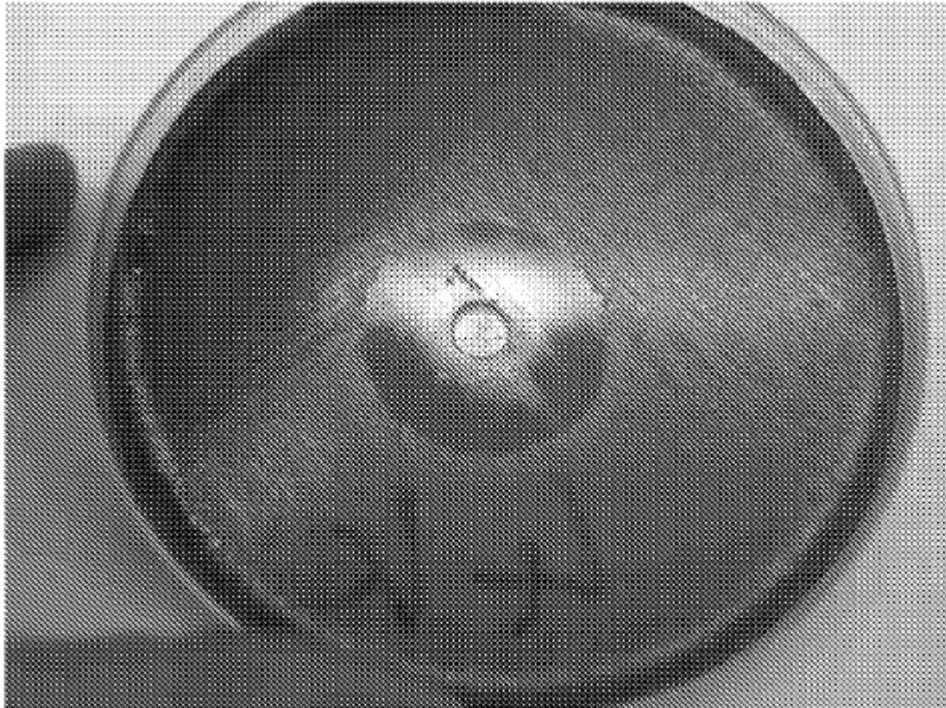
File #1 = HBO000-3

Number of Scans :

View Mode: Peaks

14/04/2023 09:52 PM Page 4

Fig. 2



**Fig. 3**