

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 707 876**

51 Int. Cl.:

A23K 20/111	(2006.01)	A61K 31/216	(2006.01)
A23K 20/121	(2006.01)	A61K 31/22	(2006.01)
A23K 20/10	(2006.01)	A61K 31/24	(2006.01)
A23K 20/105	(2006.01)	A61K 31/275	(2006.01)
A23K 50/10	(2006.01)	A61K 31/34	(2006.01)
A61K 31/04	(2006.01)	A61K 31/345	(2006.01)
A61K 31/045	(2006.01)	A61K 31/4406	(2006.01)
A61K 31/08	(2006.01)	C07D 213/82	(2006.01)
A61K 31/18	(2006.01)	C07D 493/04	(2006.01)
A61K 31/21	(2006.01)	C07D 307/72	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2011 PCT/EP2011/072707**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012 WO12084629**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2011 E 11819164 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018 EP 2654455**

54 Título: **Uso de moléculas orgánicas de nitrooxi en pienso para reducir la emisión de metano en rumiantes**

30 Prioridad:

20.12.2010 EP 10195857
26.08.2011 EP 11178994

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.04.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

DUVAL, STEPHANE y
KINDERMANN, MAIK

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 707 876 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de moléculas orgánicas de nitrooxi en pienso para reducir la emisión de metano en rumiantes

La presente invención se refiere al uso de al menos una molécula orgánica sustituida en cualquier posición con al menos un grupo nitrooxi para reducir la producción de metano que emana de las actividades digestivas de los rumiantes.

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

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

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

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

Además, la valoración del protocolo de Kyoto seguido de la cumbre climática de Copenhague de 2009 sitúa un aumento de prioridad en la disminución de las emisiones de metano como parte de una estrategia de múltiples gases. En la actualidad, los aditivos más eficaces utilizados para reducir la formación de metano contienen antibióticos que disminuyen la proliferación de microorganismos que proporcionan hidrógeno (H₂) a los metanógenos (Sauer et al. 1998 American Society of Animal Science; 76: 906-914). Sin embargo, el efecto de los antibióticos en la formación de metano tiene algunas desventajas debido a la rápida adaptación de la flora microbiana y/o al desarrollo de resistencias que conducen a la pérdida completa del efecto pretendido en un corto período de tiempo (2 a 3 semanas), y como consecuencia se ha prohibido el uso de antibióticos en Europa para uso no terapéutico.

Se han publicado recientemente (documento de patente WO 2010072584) productos no antibióticos (derivados de ácidos biliares) que conducen a la reducción de la emisión de metano, cuando se someten a ensayo usando un modelo de simulación de rumen *in vitro*. Sin embargo, la cantidad requerida para producir una reducción moderada de la emisión de metano no es compatible con las restricciones de coste de la industria de pienso de rumiantes.

Además, se han descrito numerosos extractos de plantas naturales (ajo: documento de patente WO 2009150264, yuca, canela, ruibarbo...) en la literatura científica como soluciones potentes para reducir la emisión de metano en rumiantes basándose en experimentos *in vitro*. Sin embargo, ninguna de estas soluciones se ha convertido en un producto comercial debido a efectos secundarios (residuos en la leche), debido a la falta de eficacia cuando se someten a ensayo *in vivo*, o debido a la cantidad muy elevada de aditivo que se necesita suministrar al animal para generar una reducción de metano significativa.

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

En estas circunstancias existe aún la necesidad de desarrollar nuevas sustancias que reduzcan la formación de metano producido por rumiantes y que sigan una práctica fiable y generalmente aceptada y no de naturaleza medicinal. Además de reducir la emisión de metano, tales sustancias también pueden contribuir a mejorar el rendimiento del rumiante al mejorar la proporción de conversión de pienso, reducir la ingesta de pienso, mejorar la ganancia de peso, y/o mejorar la res muerta, o el rendimiento de leche.

Sorprendentemente, los presentes inventores acaban de descubrir que el compuesto que se especifica posteriormente en el presente documento, tiene un gran potencial para su uso en pienso animal con el fin de reducir básicamente la formación de metano sin afectar la fermentación microbiana de un modo que sería perjudicial para el animal hospedador. Además, los compuestos de la presente invención también presentan un gran beneficio con respecto al rendimiento global del animal según se mide mediante la proporción de conversión de pienso, la ingesta

de pienso, la ganancia de peso, el rendimiento de res muerta, o el rendimiento de leche. Dichos compuestos también son más estables que las descritas en la técnica anterior, más seguras para el animal y el ser humano, conducen a un efecto de reducción de metano persistente, no afectan a la palatabilidad, se pueden producir a escala industrial a un coste compatible con la industria de nutrición animal y, por encima de todo, no provocan la acumulación de ningún metabolito en la leche o carne del animal suplementado, y son activas a concentraciones muy bajas en el rumen.

En particular, los presentes inventores han observado que alimentar a los rumiantes con al menos una molécula orgánica sustituida en cualquier posición con al menos un grupo nitrooxi es muy eficaz para reducir la producción de metano que emana de las actividades digestivas de rumiantes sin afectar negativamente a la producción total de VFA, y/o mejorar el rendimiento del rumiante. Además, los presentes inventores han mostrado que, cuando se reemplaza el grupo nitrooxi por otros grupos químicos de propiedades fisicoquímicas similares, el efecto técnico en la producción de metano se pierde, demostrando que el grupo nitrooxi es clave para el efecto en la reducción de metano de la presente invención.

A partir de la solicitud de patente internacional nº. WO211/070133, se conoce que los derivados de ácido nitrooxi-carboxílico son inhibidores potentes de la metogénesis del rumen *in vitro*, y también *in vivo*. Por lo tanto, estas moléculas no se reivindican específicamente en la presente invención.

Por lo tanto, la presente invención proporciona el uso de al menos una molécula orgánica sustituida en cualquier posición con al menos un grupo nitrooxi, o una sal de esta como se define mediante la fórmula (I) como compuesto activo en pienso animal para reducir la formación de metano que emana de las actividades digestivas de rumiantes.

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

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



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

a está comprendido entre 1 y 25, preferentemente entre 1 y 10,

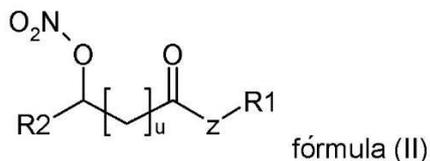
b está comprendido entre 2 y 51, preferentemente entre 2 y 21,

d está comprendido entre 0 y 8, preferentemente entre 0 y 6,

e está comprendido entre 0 y 5, preferentemente entre 0 y 3,

g está comprendido entre 0 y 3, preferentemente entre 0 y 1,

en donde ácido nitrooxi alcanóico, y/o derivados de este tal como se definen por la fórmula (II) se excluyen



en donde

u está comprendido entre 0 y 23, en donde, si $u \neq 0$, la cadena de carbono es una cadena de carbono lineal, cíclica, o lineal ramificada o alifática cíclica que puede ser mono o poliinsaturada y en cualquier forma isomérica,

Z es independientemente O, NH o N-R3, en donde, si $\text{R}_1 \neq \text{H}$, Z-R1, representa un éster o un derivado de amina secundaria,

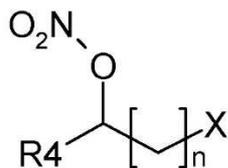
R1 es independientemente, hidrógeno o una cadena lineal, cíclica, o ramificada saturada de un grupo alquilo o alqueno que contiene de 1 a 10 átomos de carbono,

R2 es independientemente, hidrógeno o una cadena lineal, cíclica, o ramificada saturada de un grupo alquilo o alqueno que contiene de 1 a 23 átomos de carbono, y

R3 es independientemente, hidrógeno o una cadena lineal, cíclica, o ramificada saturada de un grupo alquilo o alqueno que contiene de 1 a 10 átomos de carbono.

- 5 En otra realización, los compuestos preferentes de la fórmula (I) de acuerdo con la presente invención son compuestos donde a está comprendido entre 1 y 10, preferentemente, a está comprendido entre 3 y 8.

En otra realización, los compuestos preferentes de la fórmula (I) según la presente invención son los compuestos de la fórmula (III),



fórmula (III)

- 10 en donde

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

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

X es hidrógeno, R5, $R5 \equiv N$, $-OR5$, $-OCOR5$, $-NR5R6$, $-ONO2$, $-COOR5$, $-CONR5R6$, $-NHSO2R5$, o $-SO2NHR5$,

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

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

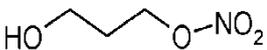
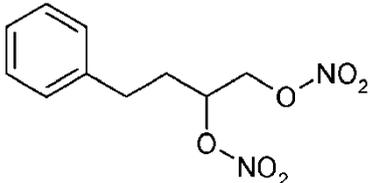
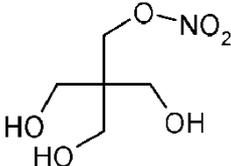
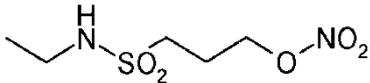
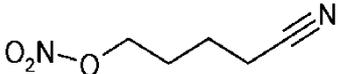
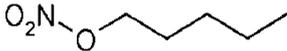
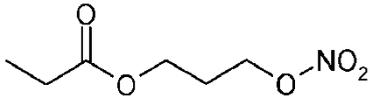
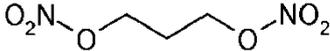
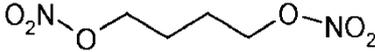
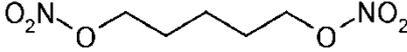
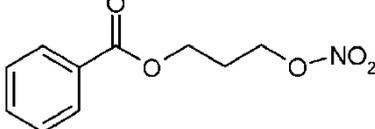
- 25 Se ha de entender en la definición anterior de los compuestos de fórmula (III) que cuando $n > 2$, la cadena de carbono puede ser lineal o estar ramificada en cualquier posición a lo largo de la cadena de carbono. Además, la cadena de carbono puede estar ramificada con múltiples ramificaciones en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

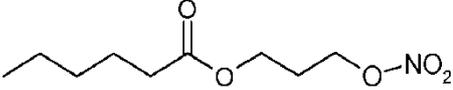
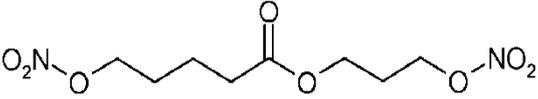
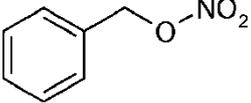
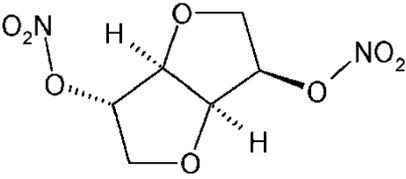
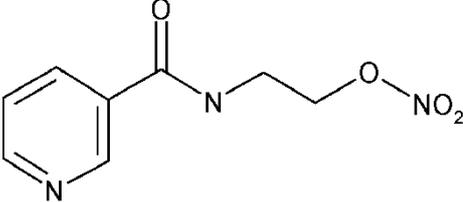
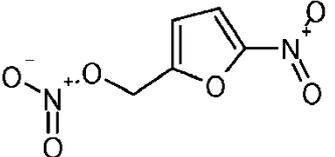
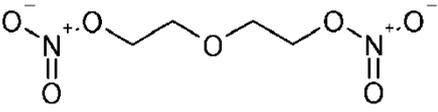
- 30 En la definición anterior de los derivados de fórmula (III) un grupo alquilo preferente es metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo, isobutilo, pentilo, neopentilo, hexilo, ciclohexilo, y 2-etil-hexilo y octilo. Además, cualquier grupo alquilo o alqueno que contiene tres o más átomos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

- 35 En otra realización, los compuestos más preferentes de fórmula (I) de acuerdo con la presente invención se seleccionan entre la lista de compuestos, y las sales de los mismos que comprenden: 3-nitrooxipropanol, dinitrato de racemato-4-fenilbutano-1,2-diilo, 2-(hidroximetil)-2-(nitrooximetil)-1,3-propanediol, N-etil-3-nitrooxi-propiónico sulfonil amida, 5-nitrooxi-pentanonitrilo, 5-nitrooxi-pentano, propionato de 3-nitro-oxipropilo, 1,3-bis-nitrooxipropano, 1,4-bis-nitrooxibutano, 1,5-bis-nitrooxipentano, benzoato de 3-nitrooxi-propilo, hexanoato de 3-nitrooxi-propilo, 5-nitrooxi-hexanoato de 3-nitrooxi-propilo, nitrato de bencilo, dinitrato de isosorbida, y N-[2-(Nitrooxi)etil]-3-piridinacarboxamida, 2-nitro-5-nitrooximetil-furano, y éter de bis-(2-nitrooxietilo) tal como se enumeran en la Tabla 1:

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

Identificador de comp.	Estructura molecular	Nombre químico
------------------------	----------------------	----------------

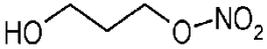
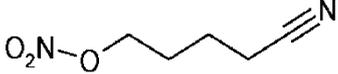
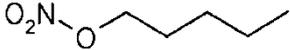
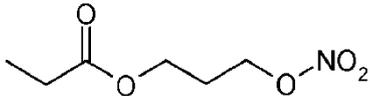
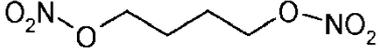
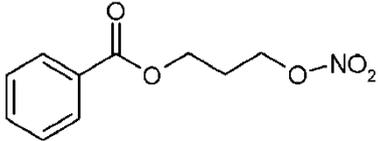
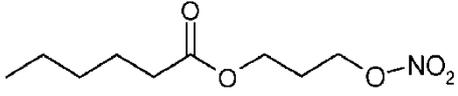
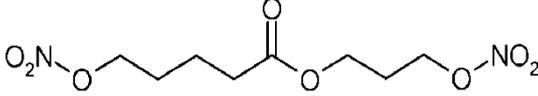
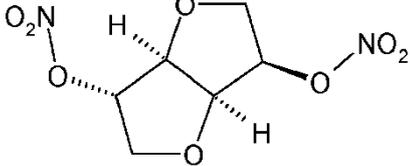
Identificador de comp.	Estructura molecular	Nombre químico
1		3-Nitrooxipropanol
2		Dinitrato de rac-4-fenilbutano-1,2-diilo
3		2-(Hidroximetil)-2-(nitrooximetil)-1,3-propanodiol
4		N-Etil-3-nitro-oxipropiónico sulfonil amida
5		5-Nitrooxi-pentanonitrilo
6		5-Nitrooxi-pentano
7		Propionato de 3-nitrooxi-propilo
8		1,3-bis-Nitrooxipropano
9		1,4-bis-Nitrooxibutano
10		1,5-bis-Nitrooxipentano
11		Benzoato de 3-nitrooxi-propilo

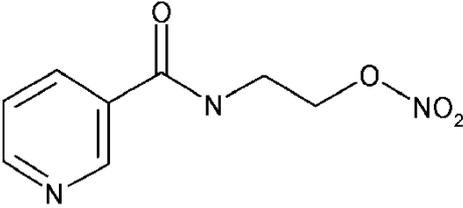
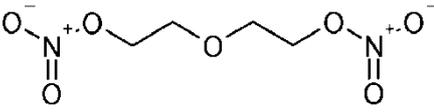
Identificador de comp.	Estructura molecular	Nombre químico
12		Hexanoato de 3-nitro-oxi-propilo
13		5-Nitrooxi-hexanoato de 3-nitro-oxi-propilo
14		Nitrato de bencilo
15		Dinitrato de isosorbida
16		N-[2-(Nitrooxi)etil]-3-piridinacarboxamida
17		2-Nitro-5-nitrooximetil-furano
18		Éter de bis-(2-nitrooxietilo)

5 En otra realización, los compuestos incluso más preferentes de fórmula (III) basados en la fuerza de su efecto en reducir metano se seleccionan de entre la lista de compuestos, y las sales estos, que comprende: 3-nitrooxipropanol, 5-nitrooxi-pentanonitrilo, 5-nitrooxi-pentano, propionato de 3-nitro-oxipropilo, 1,3-bis-nitrooxipropano, 1,4-bis-nitrooxibutano, 1,5-bis-nitrooxipentano, benzoato de 3-nitrooxi-propilo, hexanoato de 3-nitrooxi-propilo, 5-nitrooxi-hexanoato de 3-nitrooxi-propilo, dinitrato de isosorbida, y N-[2-(Nitrooxi)etil]-3-piridinacarboxamida, y éter de bis-(2-nitrooxietilo) tal como se enumera en la Tabla 2:

Tabla 2: compuestos más preferentes de la fórmula (I) de acuerdo con la presente invención

ES 2 707 876 T3

Identificador de comp.	Estructura molecular	Nombre químico
1		3-Nitrooxipropanol
5		5-Nitrooxi-pentanonitrilo
6		5-Nitrooxi-pentano
7		Propionato de 3-nitrooxi-propilo
8		1,3-bis-Nitrooxipropano
9		1,4-bis-Nitrooxibutano
10		1,5-bis-Nitrooxipentano
11		Benzoato de 3-nitrooxi-propilo
12		Hexanoato de 3-nitro-oxi-propilo
13		5-Nitrooxi-hexanoato de 3-nitro-oxi-propilo
15		Dinitrato de isosorbida

Identificador de comp.	Estructura molecular	Nombre químico
16		N-[2-(Nitrooxi)etil]-3-piridinacarboxamida
18		Éter de bis-(2-nitrooxietilo)

En otra realización, los compuestos más preferentes de la fórmula (I) basados en la fuerza de su efecto en reducir metano y en el proceso de producción es una mezcla de 3-nitrooxi propanol y 1,3-bis-nitrooxipropano. Preferentemente, la relación entre 3-nitrooxi propanol/1,3-bis-nitrooxipropano está comprendida entre 1/10 y 1000/1, más preferentemente, entre 1/5 y 100/1, de manera más preferente, entre 1/1 y 10/1.

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

Los compuestos de la presente invención se pueden fabricar en principio de acuerdo con métodos sintéticos conocidos por sí mismos para moléculas nitrooxi orgánicas, y/o basándose en los métodos descritos en los ejemplos.

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

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

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

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

Otros componentes que se podrían dar junto con el compuesto según la presente invención son, por ejemplo, levaduras, y aceites esenciales, e ionforos como monensina, rumensina.

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

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

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

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

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

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

25 Tal como se indicó anteriormente, los compuestos de la presente invención son útiles como compuestos para aditivos de pienso y composiciones de pienso de animales para rumiantes, y, en consecuencia, son útiles como los ingredientes activos en tal pienso para reducir la formación de metano en el tracto digestivo del animal.

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

35 Por lo tanto, otros aspectos de la presente invención son formulaciones, es decir aditivos de pienso y composiciones de pienso animal que contienen compuestos como se han definido anteriormente en el presente documento. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a una composición de pienso de rumiantes o un aditivo de pienso de acuerdo con la reivindicación 11. Preferentemente, la composición de pienso o aditivo de pienso es una mezcla de base para rumiantes. En una realización preferente, la composición es una premezcla mineral, una premezcla de vitaminas que incluye vitaminas y minerales o un bolo.

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

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

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

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

55

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

5 Además de los ingredientes activos de la invención, la premezcla de la invención comprende al menos una vitamina liposoluble, y/o al menos una vitamina soluble en agua, y/o al menos un mineral traza, y/o al menos un macromineral. En otras palabras, la premezcla de la invención comprende el al menos un compuesto de acuerdo con la invención junto con al menos un componente adicional seleccionado entre el grupo que consiste en vitaminas liposolubles, vitaminas solubles en agua, minerales traza, y macrominerales.

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

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

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

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

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

30

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

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

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

La presente invención también se refiere a un método para reducir la producción de metano que emana de las actividades digestivas de rumiantes, que comprende administrar por vía oral una cantidad suficiente de al menos una molécula orgánica sustituida en cualquier posición con al menos un grupo nitrooxi, o una sal esta como se define mediante la fórmula (I) con las realizaciones preferentes descritas anteriormente.

45 Además, la invención también se refiere un método, como se ha descrito anteriormente, en el que el compuesto de la fórmula (I) se administra al animal junto con al menos una sustancia activa adicional seleccionada entre el grupo que consiste en disulfuro de dialilo, aceite de ajo, isotiocianato de alilo, ácido desoxicólico, ácido quenodesoxicólico y los derivados de estos.

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

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

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

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

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

Ejemplos

Ejemplo 1: ensayo in vitro para producción de metano

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

Principio:

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

25

Reactivos:

Solución de elementos masa:

- 6,2 g de dihidrogenofosfato potásico (KH_2PO_4)
- 0,6 g de heptahidrato de sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- 30 – 9 ml de ácido fosfórico concentrado (1 mol/l)
- disuelto en agua destilada hasta 1 l (pH de aproximadamente 1,6).

Solución tampón:

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

Solución de elementos traza:

- 13,2 g de dihidrato de cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- 10,0 g de tetrahidrato de cloruro de manganeso(II) ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
- 1,0 g de hexahidrato de cloruro de cobalto(II) ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- 40 – 8,0 g de cloruro de hierro(III) ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- disuelto en agua destilada hasta 100 ml.

Solución de sal sódica:

- 100 mg de sal sódica

ES 2 707 876 T3

– disuelto en agua destilada hasta 100 ml.

Solución de reducción:

– se añaden en primer lugar 3 ml de hidróxido sódico ($c = 1 \text{ mol/l}$), y a continuación 427,5 mg de hidrato de sulfuro sódico ($\text{Na}_2\text{S} \cdot \text{H}_2\text{O}$) a 71,25 ml de H_2O

5 – la solución se debe preparar poco antes de añadirse a la solución de medio.

Procedimiento:

Pesado de la muestra:

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

Preparación de la solución de medio:

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

711 ml de agua

0,18 ml de solución de elementos traza

355,5 ml de solución tampón

355,5 ml de solución de elementos masa

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

Extracción del licor de rumen:

Se añaden 750 ml de licor de rumen a aproximadamente 1.400 ml de solución de medio con agitación continua y gasificación con CO_2 .

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

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

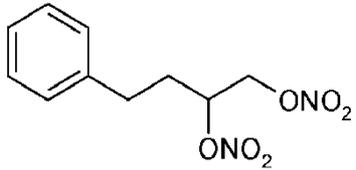
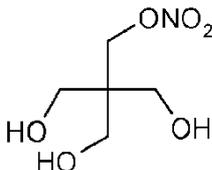
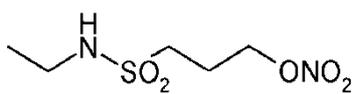
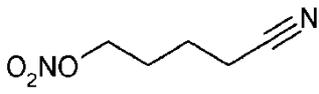
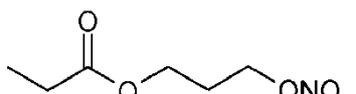
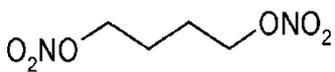
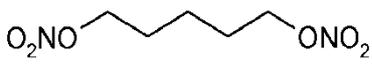
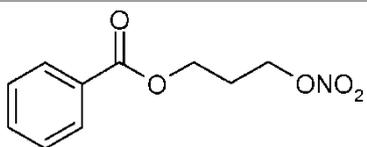
Resultados

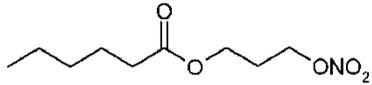
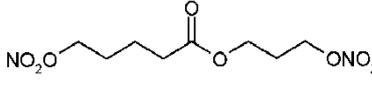
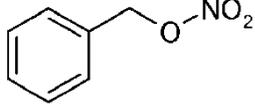
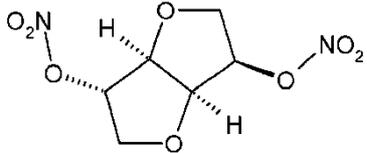
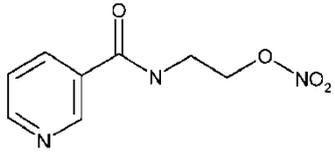
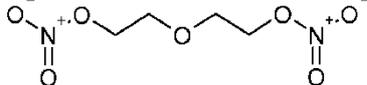
30 El alimento fermentado fue una TMR artificial (44 % de concentrado, 6 % de heno, 37 % de forraje ensilado de maíz y 13 % de forraje ensilado de hierba). Los compuestos producidos como se describe en los Ejemplos 2 a 14 se añaden a las jeringas de fermentación a una concentración de 2 a 0,005 % de materia seca (MS). Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

35 Tabla 3: Efecto de reducción de metano resultante de la media de dos experimentos con algunos compuestos de acuerdo con la presente invención (un entero en la columna tiene un efecto en el cambio de metanogénesis (%) lo que significa una reducción en el metano producido cuando se compara con el control, ningún valor significa que la concentración no se ha sometido a ensayo).

Estructura	efecto en metanogénesis (%)							
	2 % de MS	1 % de MS	0,5 % de MS	0,25 % de MS	0,1 % de MS	0,05 % de MS	0,01 % de MS	0,005 % de MS
	100		100		100	100	79	20

ES 2 707 876 T3

Estructura	efecto en metanogénesis (%)							
	2 % de MS	1 % de MS	0,5 % de MS	0,25 % de MS	0,1 % de MS	0,05 % de MS	0,01 % de MS	0,005 % de MS
	10		4					
	85		6					
	99		99		24	10		
					99	95	12	7
					100	100	33	4
					100	100	21	6
					99	100	98	29
					100	100	92	16
					100	100	45	6
		99			99		11	

Estructura	efecto en metanogénesis (%)							
	2 % de MS	1 % de MS	0,5 % de MS	0,25 % de MS	0,1 % de MS	0,05 % de MS	0,01 % de MS	0,005 % de MS
		98			99		42	
								
	100		100		37	3		
		100						
		100						
					100	99	64	3

Ejemplo 2: ejemplo comparativo: ensayo *in vitro* para la producción de metano

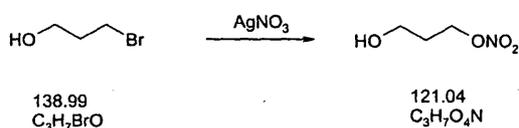
5 El mismo ensayo *in vitro*, como se describe en el Ejemplo 1, se ha realizado con una serie de moléculas, donde el grupo nitrooxi se ha remplazado con grupos orgánicos diferentes. Además, la sal inorgánica NaNO₃ también se ha sometido a ensayo. Véanse los resultados en la Tabla 4. Estos datos demuestran que una actividad en la reducción de metano significativa solo se observa cuando el grupo nitrooxi está presente en la serie.

10 Tabla 4: Efecto de reducción del metano resultante de la media de dos experimentos con 3-nitrooxipropanol de según la presente invención en comparación con compuestos similares en los que el grupo nitrooxi se ha reemplazado. (Un entero en la columna tiene un efecto en el cambio de metanogénesis (%) lo que significa una reducción en el metano producido cuando se compara con control, ningún valor significa que la concentración no se ha sometido a ensayo).

Estructura	efecto en metanogénesis (%)				
	2 % de MS	0,5 % de MS	0,1 % de MS	0,05 % de MS	0,01 % de MS

Estructura	efecto en metanogénesis (%)				
	2 % de MS	0,5 % de MS	0,1 % de MS	0,05 % de MS	0,01 % de MS
	100	100	100		79
			2		
			8		
			6		
			2		
NaNO3	23	2			

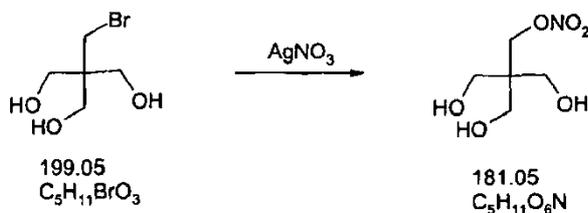
Ejemplo 3: síntesis de 3-nitrooxipropanol



5 Se disolvieron 50,1 mmol de 3-bromopropanol en 100 ml de acetonitrilo y se añadieron 125,25 mmol de nitrato de plata a un matraz protegido de la luz. La suspensión se agitó durante 21 horas a 70 °C. Después de enfriarse a temperatura ambiente, la suspensión se filtró y concentró al vacío. El residuo se disolvió en agua y se extrajo dos veces con TMBE. Las fases orgánicas se lavaron con agua y salmuera, se combinaron, se secaron con Na₂SO₄ y el solvente se eliminó al vacío dejando 5,63 g.

10 El producto en crudo se purificó por cromatografía flash sobre gel de silicio utilizando heptano/acetato de etilo 2:1; rendimiento 4,82 g (38,8 mmol, 77,4 %).

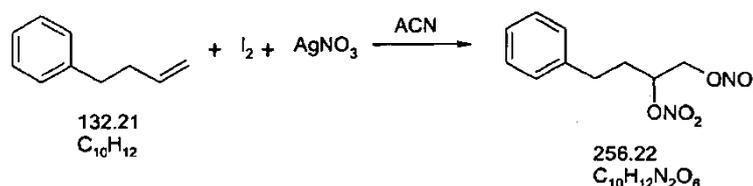
Ejemplo 4: síntesis de 2-(hidroximetil)-2-(nitrooximetil)-1,3-propanodiol



15 Se disolvieron 5 mmol de 2-(bromometil)-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol en 20 ml de acetonitrilo y se añadieron 15 mmol de nitrato de plata a un matraz protegido de la luz. La suspensión se agitó durante 24 horas a 70 °C. Después de enfriarse a temperatura ambiente, la suspensión se filtró y el solvente se eliminó en vacío dejando 3,05 g.

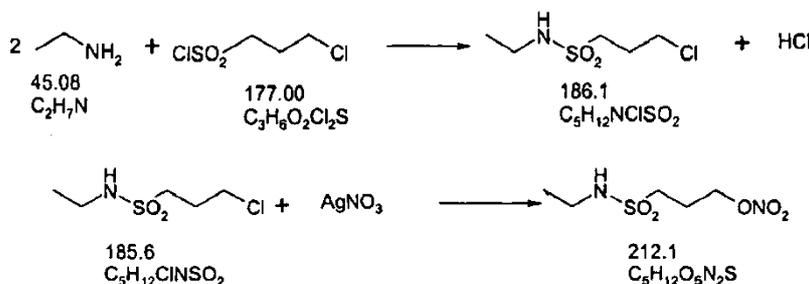
El producto en crudo se purificó por cromatografía flash sobre gel de silicio utilizando diclorometano/metanol 50:1; rendimiento: 0,36 g (1,99 mmol, 40,2 %).

Ejemplo 5: síntesis de dinitrato de rac-4-fenilbutano-1,2-diilo



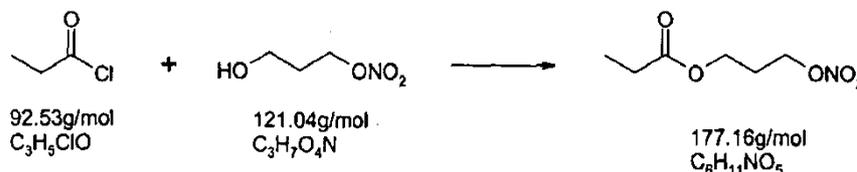
- 5 Se disolvieron 7,5 mmol de 4-fenil-1-buteno en 40 ml de acetonitrilo, se añadieron 20,3 mmol de nitrato de plata y 7,5 mmol de yodo a un matraz protegido de la luz. Esta suspensión se agitó durante 30 minutos a 25 °C y luego durante 16 horas a 79 °C. Después de enfriarse a temperatura ambiente, la suspensión se filtró y se lavó con acetato de etilo. El filtrado se extrajo tres veces con agua y se lavó con salmuera, se secó con Na₂SO₄ y el solvente se eliminó al vacío dejando 1,92 g.
- 10 El producto en crudo se purificó por cromatografía flash sobre gel de silicio utilizando hexano/acetato de etilo 10:1; rendimiento: 0,52 g (2,03 mmol, 27 %).

Ejemplo 6: síntesis de N-etil-3-nitrooxipropiónico sulfonil amida



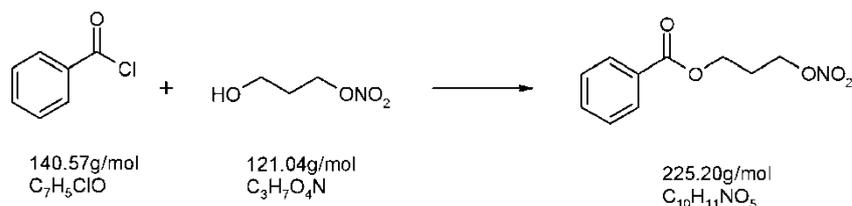
- 15
- 20 En un matraz, se disolvieron 17 mmol de cloruro de sulfonil 3-cloropropiónico en 5 ml de tetra-hidrofurano. Se añadieron 33,3 mmol de etilamina durante un periodo de 45 minutos. Después de eso, el solvente se eliminó al vacío. El residuo se disolvió en agua, se extrajo tres veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron con Na₂SO₄ y el solvente se eliminó al vacío.
- 25 El residuo se disolvió en 50 ml de acetonitrilo y se añadieron 60 mmol de nitrato de plata a un matraz protegido de la luz. La suspensión se agitó durante 41 horas a 70 °C. Después de enfriarse a temperatura ambiente, la suspensión se filtró y concentró al vacío. El residuo se disolvió en diclorometano y se extrajo con agua. La fase de agua se volvió a lavar dos veces con diclorometano. La fase orgánica combinada se lavó con agua y salmuera, se secó con Na₂SO₄ y el solvente se eliminó al vacío; rendimiento: 3,05 g (14,5 mmol, 84,5 %).

Ejemplo 7: síntesis de propionato de 3-nitrooxi-propilo



- 30 Se disolvieron 9,1 mmol de cloruro de propionilo en 10 ml de TMBE y se enfriaron a 3 °C. Se gotearon 8,25 mmol de 3-nitrooxipropanol y 9,1 mmol de trietilamina en 5 ml de TMBE durante un periodo de 5 min de 3 a 6 °C. Después de 2 horas y 30 minutos de agitación sin enfriamiento, la mezcla de reacción se extrajo con 1N de HCl, dos veces con agua, se lavó con salmuera, se secó con Na₂SO₄ y el solvente se eliminó al vacío dejando 1,35 g.
- 35 El producto en crudo se purificó por cromatografía flash sobre gel de silicio utilizando hexano/acetato de etilo 4:1; rendimiento: 1,14 g (6,4 mmol, 78,0 %).

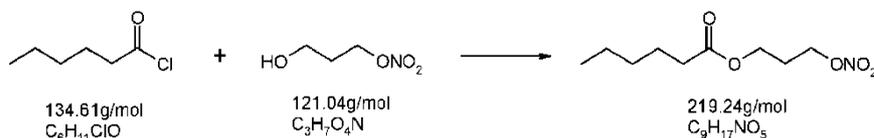
Ejemplo 8: síntesis de benzoato de 3-nitrooxi-propilo



- 5 Se disolvieron 16,5 ml de 3-nitrooxipropanol en 10 ml de TMBE y 18,2 mmol de trietilamina se enfriaron a 3 °C. Se gotearon 18,2 mmol de cloruro de benzoilo en 5 ml de TMBE durante un periodo de 7 minutos de 3 a 6 °C. Después de 24 horas y 30 minutos de agitación sin enfriamiento, la mezcla de reacción se extrajo con saturado. NaHCO_3 , agua, 1N de HCl, tres veces con agua, se lavó con salmuera, se secó con Na_2SO_4 y el solvente se eliminó al vacío dejando 3,3 g.

El producto en crudo se purificó por cromatografía flash sobre gel de silicio utilizando un gradiente de hexano/acetato de etilo de 1:0 a 2:1; rendimiento: 0,66 g (2,9 mmol, 17,7 %).

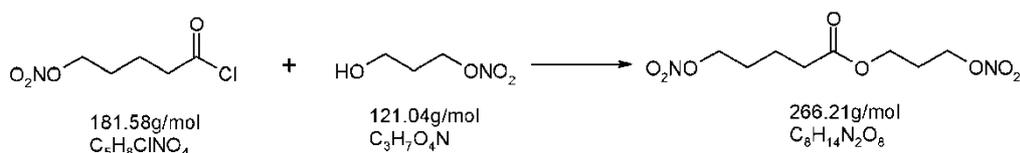
- 10 Ejemplo 9: síntesis de hexanoato de 3-nitrooxi-propilo



- 15 Se disolvieron 20 mmol de 3-nitrooxipropanol en 10 ml de dietiléter y 20 mmol de trietilamina se enfriaron a 0 °C. Se añadieron 18,2 mmol de hexoilcloruro durante un periodo de 5 minutos de 0 a 5°C. Después de 19 horas de agitación sin enfriamiento, la mezcla de reacción se extrajo con 1N de HCl, dos veces con agua, se lavó con salmuera, se secó con Na_2SO_4 y el solvente se eliminó al vacío dejando 3,1 g.

El producto en crudo se purificó por cromatografía flash sobre gel de silicio utilizando heptano/acetato de etilo 4:1; rendimiento: 2,4 g (10,9 mmol, 60,0 %).

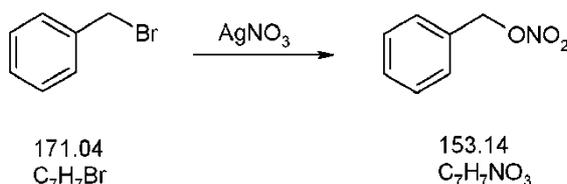
- 20 Ejemplo 10: síntesis de 5-nitrooxi-hexanoato de 3-nitrooxi-propilo



- 25 Se disolvieron 20 mmol de 3-nitrooxipropanol en 10 ml de dietiléter y 20 mmol de trietilamina se enfriaron a 0 °C. Se gotearon 18,2 mmol de 5-nitrooxipentoilcloruro durante un periodo de 5 minutos de 0 a 5°C. Después de agitación durante la noche sin enfriamiento, la mezcla de reacción se extrajo con 1N de HCl, dos veces con agua, se lavó con salmuera, se secó con Na_2SO_4 y el solvente se eliminó al vacío.

El producto en crudo se purificó por cromatografía flash sobre gel de silicio utilizando heptano/acetato de etilo 4:1; rendimiento: 2,4 g (9,1 mmol, 50,0 %).

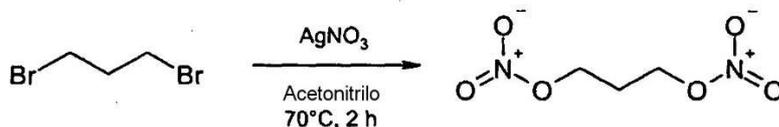
- 30 Ejemplo 11: síntesis de nitrato de bencilo:



- 35 Se disolvieron 10 mmol de bromuro de bencilo en 80 ml de acetonitrilo y se añadieron 25 mmol de nitrato de plata a un matraz protegido de la luz. La suspensión se agitó durante 5 horas a 70 °C. Después de enfriarse a temperatura ambiente, la suspensión se filtró y concentró al vacío. El residuo se disolvió en diclorometano y se extrajo con agua.

La fase de agua se volvió a lavar dos veces con diclorometano. La fase orgánica combinada se lavó con agua y salmuera, se secó con Na₂SO₄ y el solvente se eliminó al vacío; rendimiento: 1,55 g (10,1 mmol, 100 %).

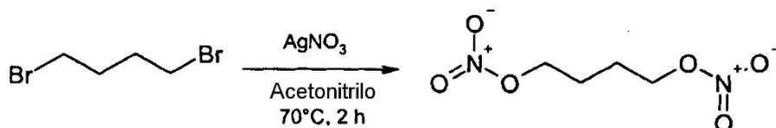
Ejemplo 12: síntesis de 1,3-bis-nitrooxi-propano



5 Se añadió nitrato de plata (3,70 g, 2,2 eq) a una solución de 1,3-dibromopropano (2,00 g, 1,0 eq) en 20,0 ml de acetonitrilo seco. La mezcla de reacción se calentó a 70 °C durante 2 horas en la oscuridad. La mezcla resultante se filtró a través de celita y el filtrado se concentró. El residuo se disolvió en agua (50,0 ml), se extrajo con diclorometano (2 x 50,0 ml), se secó sobre sulfato de magnesio y los solventes se evaporaron al vacío para dar 1,44 g de compuesto como líquido incoloro (rendimiento = 87 %).

10

Ejemplo 13: síntesis de 1,4-bis-nitrooxi-butano

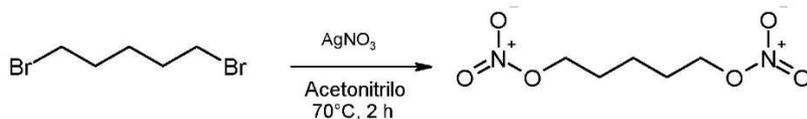


15

Se añadió nitrato de plata (3,50 g, 2,2 eq) a una solución de 1,4-dibromopropano (2,00 g, 1,0 eq) en 20,0 ml de acetonitrilo seco. La mezcla de reacción se calentó a 70 °C durante 2 horas en la oscuridad. La mezcla resultante se filtró a través de celita y el filtrado se concentró. El residuo se disolvió en agua (50,0 ml), se extrajo con diclorometano (2 x 50,0 ml) y se secó sobre sulfato de magnesio. Los solventes se evaporaron al vacío y dio 1,49 g de compuesto como líquido incoloro (rendimiento = 89 %).

Ejemplo 14: síntesis de 1,5-bis-nitrooxi-pentano

20



25

Se añadió nitrato de plata (3,30 g, 2,2 eq) a una solución de 1,5-dibromopropano (2,00 g, 1,0 eq) en 20,0 ml de acetonitrilo seco. La mezcla de reacción se calentó a 70 °C durante 2 horas en la oscuridad. La mezcla resultante se filtró a través de celita y el filtrado se concentró. El residuo se disolvió en agua (50,0 ml), se extrajo con diclorometano (2 x 50,0 ml) y se secó sobre sulfato de magnesio. Los solventes se evaporaron al vacío y dio 1,38 g de compuesto como líquido incoloro (rendimiento = 82 %).

Ejemplo 15: síntesis de 5-nitrooxi-pentanitrilo

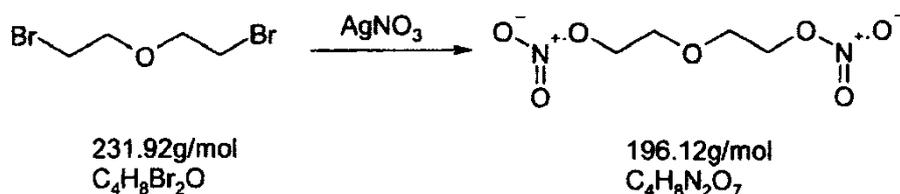


30

Se añadió nitrato de plata (4,60 g, 1,1 eq) a una solución de 5-bromovaleronitrilo (4,00 g, 1,0 eq) en 40,0 ml de acetonitrilo seco. La mezcla de reacción se calentó a 70 °C durante 2 horas en la oscuridad. La mezcla resultante se filtró a través de celita y el filtrado se concentró. El residuo se disolvió en agua (50,0 ml), se extrajo con diclorometano (2 x 50,0 ml) y se secó sobre sulfato de magnesio. Los solventes se evaporaron al vacío y dio 3,56 g de compuesto como líquido incoloro (rendimiento = 99 %).

35

Ejemplo 16: síntesis de éter de bis-(2-nitrooxietilo)



5 Se disolvieron 16,05 mmol de éter de bis-(2-bromoetilo) en 30 ml de acetonitrilo y se añadieron 40,13 mmol de nitrato de plata a un matraz protegido de la luz. La suspensión se agitó durante 16 horas a 70°C. Después de enfriarse a temperatura ambiente, la suspensión se filtró y concentró al vacío. El residuo se disolvió en agua y se extrajo dos veces con TMBE. Las fases orgánicas se lavaron con agua y salmuera, se combinaron, se secaron sobre Na_2SO_4 y el solvente se eliminó al vacío dejando 3,06 g. El producto en crudo se purificó sobre gel de silicio utilizando heptano/acetato de etilo 1:1; rendimiento: 2,94 g (15,0mmol, 93,4%).

10 Ejemplo 17: efecto in vivo de 3-nitrooxipropanol comparado con etil-3-nitrooxipropionato

Materiales y métodos

15 Se canularon 10 ovejas en el rumen. El ensayo empezó un mes después de la operación quirúrgica. Hubo 3 tratamientos: control, aditivo 1 y aditivo 2, ambos con una dosis única. El aditivo 1 es etil-3-nitrooxipropionato, y el aditivo 2 es 3-nitrooxipropanol de la presente invención. El diseño experimental consistió en un cuadrado latino 3x3 con 3 ovejas por tratamiento en cada periodo y 3 periodos consecutivos. Cada periodo incluyó 28 días de adaptación al tratamiento más dos días consecutivos de mediciones de metano en cámaras para recoger las muestras de rumen. En el transcurso de la fase de adaptación, se hizo una medición de metano a medio plazo durante un día el día 14. Además, durante los días 22 y 23, las muestras de heno de alfalfa y avena, colocadas en bolsas de nailon, se incubaron en el rumen de las ovejas para determinar la degradación ruminal de la materia seca. Durante los dos días de mediciones de metano en cámaras (días 29 y 30), las muestras de contenido de rumen se recogieron dos horas después de la alimentación de la mañana, se submuestrearon y se congelaron inmediatamente antes de extracción de ADN y determinación de ácidos grasos volátiles y concentración de nitrógeno amoniacal. Los animales de experimentación se distribuyeron aleatoriamente en tres subgrupos de 3 animales cada uno y se asignaron aleatoriamente a uno de los tres tratamientos (control, aditivo 1 y aditivo 2). Los 3 subgrupos empezaron la adaptación a la dieta con un espacio de dos días de manera que estuvieran en el mismo día de adaptación antes de medición de metano en las cámaras. Los animales se mantuvieron individualmente en jaulas con acceso constante a agua dulce. Se proporcionó una dieta que consistía en heno de alfalfa cortado a 15-20 cm y avena en una relación 60:40 más suplemento de mineral-vitamina a aproximadamente 1,1 veces el nivel de mantenimiento de energía en dos comidas iguales a las 9:00 y 14:00 horas. La ingesta de materia fresca se vigiló diariamente para cada animal durante todo el ensayo.

El aditivo se proporcionó dos veces al día a través de la cánula ruminal a la misma vez que se alimentaban. La cantidad correspondiente de cada aditivo (100 mg por animal y día para ambos aditivos) se pipeteó en 10 gramos de avena molida y se envolvió en papel de celulosa inmediatamente antes de colocarla en el rumen. Ya que la molécula activa es volátil, el procedimiento mencionado previamente se llevó a cabo en una habitación fría a 4°C.

35 Medición de metano y recogida de muestras

Se utilizó un juego de cuatro cámaras de metano. En los días 14, 29 y 30, los animales se colocaron en las cámaras para mediciones de metano. Cada cámara medía 1,8 m de ancho x 1,8 de profundidad x 1,5 de alto. La temperatura del aire de la cámara se mantuvo entre 15 y 20°C. Dentro de cada cámara, los animales se contuvieron individualmente en las mismas jaulas que durante la adaptación. Las interrupciones tuvieron lugar diariamente a las 9:00 horas, cuando el suelo de la cámara se limpiaba, y los animales eran alimentados. Estas interrupciones tuvieron poco impacto en las emisiones diarias de metano porque los flujos se calculaban tres veces al día y, entonces, se promediaban para derivar el valor de emisión de 23 horas. El flujo de aire y concentración de metano se midieron para los conductos de entrada y salida de flujo de cada cámara. La velocidad del aire se vigiló continuamente durante el día en el conducto de extracción para cada cámara. La corriente de aire en cada uno de los 4 conductos (cámaras 1, 2 y 3 y fondo) se submuestreó, y se midió la concentración de metano continuamente utilizando un analizador de gas ADM MGA3000 (Spurling works, Herts, Reino Unido). Se tardó 11 minutos en muestrear secuencialmente el flujo de aire en todos los conductos de entrada y extracción de aire en las cámaras (3 minutos en las cámaras 1, 2, 3, 2 minutos para el fondo). En resumen, el flujo de metano para cada cámara se calculó para cada día de medición a partir de la diferencia de concentraciones de metano en la entrada de aire fresco y en la cámara de extracción y las velocidades medias del aire.

Análisis de muestras de rumen

Las muestras de contenidos de rumen se liofilizaron y mezclaron cuidadosamente por disrupción física utilizando un homogenizador "bead beater" (Mini-bead Beater; BioSpec Products, Bartlesville, OK, EE. UU.) antes de extracción

de ADN, que se realizó a partir de aproximadamente 50 mg de muestra utilizando un QIAamp® DNA Stool Mini Kit (Qiagen Ltd, Sussex Occidental, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del fabricante con la modificación de que se utilizó una temperatura mayor (95°C) para incubación de lisis. Las muestras de ADN se utilizaron como plantillas para amplificación de PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR). La abundancia de bacterias totales, protozoos totales y arqueas metanogénicas totales se cuantificó por medio de PCR a tiempo real (qPCR). Se utilizaron diferentes conjuntos de cebadores para amplificar las bacterias totales dirigidas al gen ARNr 16S (Maeda *et al.*, 2003), y los protozoos totales dirigidos al gen ARNr 18S (Sylvester *et al.* 2005). Los cebadores diseñados para la detección de arqueas metanogénicas se dirigieron contra el gen metil coenzima M reductasa (*mcrA*) (Denman *et al.*, 2007). La mezcla de amplificaciones contuvo 11,5 µl de 2X RT-PCR supermix Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, EE. UU.), 0,4 µl de cada cebador y 0,5 µl de muestra en un volumen final de 23 µl. La eficiencia de la amplificación se evaluó para cada par de cebadores con el siguiente programa: un ciclo de 5 minutos a 95° C, 40 ciclos a 95° C durante 15 segundos, 60° C durante 30 segundos, 72° durante 55 segundos y 75° C durante 6 segundos para mediciones de emisión fluorescente. La curva de fusión se construyó al aumentar la temperatura de 55° C a 95° C y las lecturas se tomaron cada 5° C. La amplificación de cada grupo objetivo se llevó a cabo con el siguiente programa: un ciclo de 5 minutos a 95° C, 40 ciclos a 95° C durante 15 segundos, 15 segundos a 60° C y 72° C durante 45 segundos (incluida la medición de emisión fluorescente) y una curva de fusión con una temperatura de punto de referencia a 45° C y una temperatura final de 95° C. La cantidad absoluta de bacterias, protozoos y arqueas metanogénicas, expresada como el número de copias de ADN, se determinó utilizando el pCR®4-TOPO plásmido (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EE. UU.) como estándar. El producto PCR obtenido utilizando el conjunto respectivo de cebadores se purificó y luego se clonó en pCR®4-TOPO plásmido (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EE. UU.) para producir plásmidos recombinantes. Una única colonia, verificada para el inserto esperado utilizando PCR, creció en un medio sólido con antibióticos y X-gal durante la noche. Después de esto, un cribado de colonias de *E. coli* transformadas se hizo y se seleccionaron aleatoriamente algunos de los positivos. Después de comprobar la presencia de los fragmentos insertados en las colonias por PCR, se hizo un cultivo masivo de colonias positivas en un medio líquido durante la noche. Los plásmidos que pertenecían a estos cultivos se extrajeron utilizando el Pure Link® Miniprep kit (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EE. UU.) y entonces se secuenciaron para verificar la presencia del fragmento insertado. El número de copias del gen ARNr 16S presentes en los extractos de plásmido se calcularon utilizando la concentración de ADN plásmido y la masa molecular del vector con el inserto. El plásmido concentrado se diluyó repetidamente (10 veces) para proporcionar un intervalo de copias 10⁸ a 10² para generar una curva estándar.

Se utilizó determinación de abundancia relativa para arqueas metanogénicas y protozoos tal como describieron Denman y McSweeney (2006) utilizando el ARN 16S como gen de referencia. Los ácidos grasos volátiles se analizaron por cromatografía de gases y la concentración de nitrógeno amoniacal por colorimetría seguido de los protocolos establecidos en nuestro laboratorio (Martín-García *et al.*, 2004).

35 Degradabilidad del rumen

Tres gramos de pienso molido de 2 mm se colocaron en bolsas de nailon de 5 cm x 10 cm con un tamaño de poro de 50 µm (#R510 Ankom *in situ* bags, Macedon NY, EE. UU.). Los dos ingredientes utilizados en las dietas de los animales se sometieron a ensayo: avena y heno de alfalfa. Se incubaron bolsas con avena en el rumen durante 24 horas, mientras que las de heno de alfalfa durante 48 horas. Los tiempos de incubación se eligieron basándose en los tiempos de permanencia medios en el rumen de diferentes piensos. En los días 22 y 23, hubo dos bolsas por pienso y animal y periodo. Las bolsas se colocaron en el rumen inmediatamente después de la alimentación de la mañana. En 24 o 48 horas, se sacaron del rumen, se lavaron con agua fría y se congelaron a -20°C. Al final de cada periodo de tiempo, las bolsas congeladas se lavaron en una lavadora utilizando un programa corto de agua fría incluidas dos bolsas por pienso que no se habían incubado en el rumen para dar cuenta de la solubilidad. Después del lavado, las bolsas se colocaron en el horno a 60°C durante 48 horas. La degradabilidad del rumen (%) se calculó como la pérdida de materia seca durante el tiempo de incubación.

Cuidado de los animales de experimentación

Todos los procedimientos de gestión y experimentación con las ovejas se llevaron a cabo por personal cualificado en estricto cumplimiento de las directrices españolas (Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre de 2005) sobre protección para animales utilizados en experimentación. La temperatura, humedad y aire formados en las cámaras se vigilaron cuidadosamente considerando las condiciones de bienestar de los animales. La concentración de CO₂ también se vigiló continuamente para mantenerla dentro de los límites que garantizan una calidad de aire y tasa de renovación buenas. Los animales no mostraron ningún comportamiento de estrés mientras se distribuyeron en cámaras.

55 Análisis estadístico

Emisiones de metano individuales, perfiles de VFA, relación de acetato a propionato, concentración de nitrógeno amoniacal, transformaciones log₁₀ de la concentración de bacterias totales, protozoos totales y arqueas metanogénicas totales y la abundancia relativa se analizaron para determinar el efecto de incluir el aditivo. El error estándar de la media (EEM) se computó para cada análisis. La media se comparó además utilizando una prueba de diferencia mínima significativa (DMS).

Resultados

La ingesta de materia seca no se vio afectada ($P>0,05$) por el tratamiento y solo se observó una ligera reducción en las ingestas cuando los animales se introdujeron en las cámaras de metano los días 14 y 30.

5 Tal como se describió para ingestas, el peso corporal (como media de los pesos registrados antes y después de las mediciones en la cámara) no fue diferente ($P>0,05$) entre tratamientos (Tabla 5). Las emisiones de metano, expresadas como litros por kg de ingesta de materia fresca, se redujeron significativamente ($P=0,020$) el día 14 cuando ambos aditivos se incorporaron en la dieta. La reducción observada contra control fue un 14 % y un 23 %, respectivamente, para los aditivos 1 y 2. Cuando las emisiones de metano se registraron dos semanas después, los días 29 y 30 aún hubo una reducción numéricamente, aunque no alcanzó la significación estadística ($P=0,061$ y 10 0,183 para los días 29 y 30, respectivamente). Si las mediciones registradas durante los dos últimos días consecutivos se juntan, el efecto de la adición muestra una tendencia similar ($P=0,092$) a la de los valores considerados de manera separada.

Tabla 5. Efecto de la adición de los aditivos 1 y 2 en los pesos corporales, ingestas y emisiones de metano por oveja medidos en los días 14, 29 y 30 después de comenzar el tratamiento.

Tiempo	Elemento	Control	Aditivo 1	Aditivo 2	EEM	valor P
día 14	ingesta, kg/día	0,819	0,849	0,867		
	CH4 l, día	24,6	21,9	20,0		
	CH4 l/kg de ingesta	29,9	25,6	22,5	2,31	0,020
día 29	ingesta, kg/día	0,856	0,944	0,922		
	CH4 l, día	22,0	20,9	18,3		
	CH4 l/kg de ingesta	25,8	21,7	19,6	2,12	0,061
día 30	ingesta, kg/día	0,760	0,925	0,747		
	CH4 l, día	22,7	21,8	19,7		
	CH4 l/kg de ingesta	29,8	23,2	25,6	2,34	0,183
días 29-30	ingesta, kg/día	0,780	0,933	0,823		
	CH4 l, día	21,8	21,5	19,1		
	CH4 l/kg de ingesta	28,2	22,6	23,1	2,17	0,092

^{a,b} Los valores en una fila que no comparten letras de superíndice comunes difieren significativamente $P<0,05$.

* La media de peso antes y después de mediciones de cámara.

EEM: Error estándar de la media

ES 2 707 876 T3

Tabla 6. Efecto de la adición del aditivo 1 y 2 en el perfil de ácidos grasos volátiles (mol/100 mol), concentración de nitrógeno amoniacal (mg/100 ml) y degradación de materia seca (DMS %) de avena (24 horas) y heno de alfalfa (48 horas) en el rumen de oveja.

	Control	Aditivo 1	Aditivo 2	EEM	valor P
Acetato	69,2 ^c	67,5 ^b	64,5 ^a	0,742	0,007
Propionato	14,3 ^a	16,6 ^a	17,5 ^b	1,030	0,004
Butirato	2,08	2,05	2,11	0,818	0,353
iso-butilato	11,2	10,1	12,3	0,201	0,995
Valerato	1,91	1,94	1,82	0,194	0,100
iso-valerato	1,47	1,79	1,82	0,281	0,908
Total	57,4	58,2	57,1	5,193	0,995
C2/C3	4,91 ^b	4,09 ^a	3,89 ^a	0,262	0,002
N-NH ₃	100,1	97,3	104,1	9,157	0,924
DMS heno de alfalfa	78,6	78,3	78,8	1,22	0,725
DMS avena	74,2	74,0	70,6	2,02	0,167

^{a,b} Los valores en una fila que no comparten letras de superíndice comunes difieren significativamente P<005.
EEM: Error estándar de la media

5 El estudio de los parámetros de fermentación del rumen de muestras de rumen recogidas los días 29 y 30 mostraron un cambio en las rutas de fermentación (Tabla 5) hacia un perfil más tipo propionato en el rumen de animales que recibían ambos aditivos en comparación con control. Como consecuencia, en ambos tratamientos, la relación acetato a propionato se redujo significativamente (P=0,002). La concentración de nitrógeno amoniacal fue similar entre los tratamientos y estuvo dentro del intervalo esperado para la dieta suministrada a los animales.

10 El estudio de degradación *in sacco* en los días 22^º y 23^º no mostró un efecto del tratamiento con aditivo en la degradabilidad del rumen de tanto heno de alfalfa como de avena.

Tabla 7. El efecto de la adición de los aditivos 1 y 2 en la concentración (logaritmo de números de copias de genes/g de materia fresca) de las bacterias (ARNr 16S), protozoos (ARNr 18S) y arqueas metanogénicas (gen *mcrΔ*) totales en el rumen de oveja. La abundancia relativa (Δ Ct) en relación a bacterias totales se muestra también para protozoos y metanógenos.

	Control	Aditivo 1	Aditivo 2	Error	valor P
Bacterias totales	7,45*10 ¹⁰	9,08*10 ¹⁰	9,74*10 ¹⁰		
log10	10,8	10,9	11,0	0,123	0,607
Protozoos totales	2,84*10 ¹⁰	1,87*10 ¹⁰	2,51*10 ¹⁰		

ES 2 707 876 T3

		Control	Aditivo 1	Aditivo 2	Error	valor P
Bacterias totales		7,45*10 ¹⁰	9,08*10 ¹⁰	9,74*10 ¹⁰		
log 10		10,4	10,2	10,2	0,212	0,702
ΔCt		1,65	1,58	1,55	0,267	0,984
Arqueas	3,54*10 ⁸	2,86*10 ⁸	2,86*10 ⁸			
log10	8,54	8,45	8,34	0,133	0,511	
ΔCt	0,028	0,022	0,020	0,005	0,602	

5 La concentración relativa y total de los grupos microbianos analizados en el rumen no mostraron ninguna diferencia (P>0,05) entre tratamientos. Cuando la abundancia de tanto protozoos como arqueas metanogénicas se expresó en relación a las bacterias totales, se observó la misma falta de efecto.

Conclusiones

10 El uso de ambos aditivos dio como resultado una reducción significativa de la producción de metano y, según los perfiles VFA, también se promovió un cambio en las rutas metabólicas involucradas en la transferencia de H₂ por los aditivos. El objetivo de este ensayo fue confirmar si el tratamiento de animales durante un mes mostraba una persistencia de los resultados observados durante dos semanas de tratamiento. Esto es esencial cuando se evalúa la idoneidad del uso práctico de un aditivo de pienso. En este estudio, ambos aditivos mostraron efectos durante un mes de tratamiento en emisiones de metano que se confirmaron posteriormente por un cambio en el patrón de fermentación.

15 Por otro lado, un cambio en el patrón de fermentación podría deberse no solo a una reducción en la producción de metano, sino también a una degradación de la fibra menor que, a su vez, produciría menos acetato y, por lo tanto, reduciría la relación acetato a propionato. Para descartar que esto suceda, se llevó a cabo una evaluación de degradabilidad del rumen por incubación de bolsas de nailon con tanto avena como heno de alfalfa en el rumen de animales. Los resultados no mostraron un efecto de este tipo en la degradación de materia seca que también está respaldado por la misma biomasa bacteriana y de protozoos registrada en animales que recibían los aditivos en comparación con aquellos sin tratamiento.

20 Ejemplo 18: efecto *in vivo* de 3-nitrooxipropanol en vacas lecheras

Materiales y métodos

25 Animales: Para el estudio, se utilizaron seis vacas lecheras Holstein-Friesian lactantes fistuladas en el rumen de segunda paridad o mayor y que pesaban de 550 a 800 kg. Las vacas estaban en lactancia media en el comienzo del estudio.

Dietas experimentales: Se proporcionó una dieta de ración total mezclada única (RTM) a todas las vacas durante todo el estudio. Las vacas se alimentaron a voluntad (5 % de rechazos) durante la duración del ensayo.

30 Diseño experimental: Comenzando en lactancia media (con rendimientos de leche de 30 litros o más), las seis vacas se asignaron aleatoriamente a uno de los tres tratamientos de suplemento en un diseño de cuadrado latino 3x3 (Tabla 8). Los periodos de tratamiento tuvieron una duración de 5 semanas.

Tabla 8. Diseño experimental

	Vaca					
	Pareja 1		Pareja 2		Pareja 3	
	Cuadrado 1			Cuadrado 2		
Periodo	Vaca 888	Vaca 989	Vaca 973	Vaca 1000	Vaca 1030	Vaca 1060

	Vaca					
	Pareja 1		Pareja 2		Pareja 3	
	Cuadrado 1			Cuadrado 2		
Periodo	Vaca 888	Vaca 989	Vaca 973	Vaca 1000	Vaca 1030	Vaca 1060
1	1	2	3	1	2	3
2	2	3	1	2	3	1
3	3	1	2	3	1	2

Dietas: 1- Control

2- 3-nitrooxipropanol (500 mg/día)

3- 3-nitrooxipropanol (2500 mg/día)

- 5 Dosificación de 3 -nitrooxipropanol o placebo: Se administraron las dosis de 3-nitrooxipropanol o placebo a los animales por medio de una cánula de rumen en el momento de alimentación en la mañana y tarde.

10 Diseño del periodo: Como solo se pueden albergar dos vacas en los calorímetros indirectos a la vez, se utilizaron las vacas en parejas escalonadas por una semana. Al final de la semana 4, se movieron los animales a los calorímetros indirectos y se mantuvieron en puestos individuales donde se obtuvieron cuatro mediciones completas de 24 horas de intercambio respiratorio (producción de metano y dióxido de carbono y consumo de oxígeno) (Cammel *et al.*, 2000).

Resultados

Ingesta de pienso: No hubo un efecto significativo del producto (3-nitrooxipropanol) en la ingesta de materia seca diaria (DMI) (véase la Tabla 9).

- 15 Producción de metano: La producción de metano (litros/d) y rendimiento de metano (litros/ kg de DMI) se redujeron significativamente por el 3-nitrooxipropanol. La producción de metano fue un 93 y un 90% de los valores de control cuando se dieron las dosis de 500 y 2500 mg/d, respectivamente (véase la Tabla 9) Con respecto al rendimiento de metano, los valores correspondientes fueron un 96 y un 93% del rendimiento de metano de control, respectivamente, para la dosis baja y alta.

- 20 Tabla 9. Efecto del producto DSM alimentado en dos dosis.

	Dosis diaria, mg/d			EEM
	0	500	2500	
DMI, kg/d	18,9	18,8	18,5	0,7
CH ₄ , L/d	594	555	536	15,3
CH ₄ , L/d	425	398	384	11,0
CH ₄ , L/kg de DMI	31,3	29,9	29,2	1,2

Se observaron grandes variaciones entre animales, algunos mostraron más respuesta que otros. Estos resultados muestran el potencial de los compuestos de la presente invención para reducir la producción de metano en vacas lecheras, y arrojan luz además para mejorar el régimen de alimentación.

REIVINDICACIONES

1. Uso de al menos una molécula orgánica sustituida en cualquier posición con al menos un grupo nitrooxi, o una sal de esta como se define mediante la fórmula (I),



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

a está comprendido entre 1 y 25,

b está comprendido entre 2 y 51,

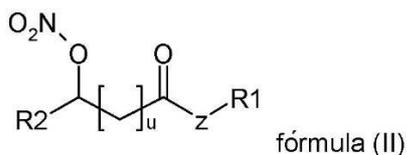
d está comprendido entre 0 y 8,

e está comprendido entre 0 y 5,

10 g está comprendido entre 0 y 3,

como compuesto activo en alimentación animal para reducir la formación de metano que emana de las actividades digestivas de rumiantes.

en donde ácido nitrooxi alcanoico, y/o derivados de este tal como se definen por la fórmula (II) se excluyen,



15 en donde

u está comprendido entre 0 y 23 y, donde, si $u \neq 0$, la cadena de carbono es una cadena de carbono lineal, cíclica, o lineal ramificada o alifática cíclica que puede ser mono o poliinsaturada en cualquier forma isomérica,

Z es independientemente O, NH o N-R3, donde, si $\text{R}_1 \neq \text{H}$, Z-R1, representa un éster o un derivado de amina secundaria,

20 R1 es independientemente, hidrógeno o una cadena lineal, cíclica, o ramificada saturada de un grupo alquilo o alquenilo que contiene de 1 a 10 átomos de carbono,

R2 es independientemente, hidrógeno o una cadena lineal, cíclica, o ramificada saturada de un grupo alquilo o alquenilo que contiene de 1 a 23 átomos de carbono,

25 R3 es independientemente, hidrógeno o una cadena lineal, cíclica, o ramificada saturada de un grupo alquilo o alquenilo que contiene de 1 a 10 átomos de carbono,

2. Uso según la reivindicación 1, donde

a está comprendido entre 1 y 10,

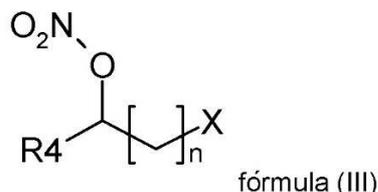
b está comprendido entre 2 y 21,

d está comprendido entre 0 y 6,

30 e está comprendido entre 0 y 3,

g está comprendido entre 0 y 1,

3. Uso según la reivindicación 1, donde la al menos una molécula orgánica de la fórmula (I) es un compuesto de la fórmula (III),

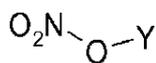


En donde

- 5 n está comprendido entre 0 y 12, comprendido preferentemente entre 0 y 6 y, en donde, si $n \neq 0$, la cadena de carbono es una cadena de carbono alifática lineal, cíclica, o ramificada que puede estar sin sustituir o sustituida con hasta 3 grupos hidroxilo, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino o nitrooxi, o una cadena de carbono de alquenilo, o alquinilo mono o poliinsaturada y en cualquier forma isomérica,
- 10 R4 es independientemente, hidrógeno o una cadena lineal, cíclica, o ramificada saturada de un grupo alquilo o alquenilo que contiene de 1 a 12, preferentemente de 1 a 6 átomos de carbono,
- X es hidrógeno, R5, R5=N, -OR5, -OCOR5, -NR5R6, -ONO2, -COOR5, -CONR5R6, -NHSO2R5, o -SO2NHR5,
- R5 y R6 son independientemente, hidrógeno, cadena de alquilo C1-C12 lineal, ramificada o cíclica, sin sustituir o sustituida con hasta 3 grupos hidroxilo, alcoxi, amino, alquilamino, dialquilamino o nitrooxi, cadena de alquenilo, o alquinilo que puede estar mono o poliinsaturada, y en cualquier forma isomérica.
- 15 4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde al menos una molécula orgánica de la fórmula (I), o una sal de esta se selecciona de entre 3-nitrooxipropanol, dinitrato de racemato-4-fenilbutano-1,2-diilo, 2-(hidroximetil)-2-(nitrooximetil)-1,3-propanediol, N-etil-3-nitrooxi-propiónico sulfonil amida, 5-nitrooxi-pentanonitrilo, 5-nitrooxi-pentano, propionato de 3-nitro-oxipropilo, 1,3-bis-nitrooxipropano, 1,4-bis-nitrooxibutano, 1,5-bis-nitrooxipentano, benzoato de 3-nitrooxi-propilo, hexanoato de 3-nitrooxi-propilo, 5-nitrooxi-hexanoato de 3-nitrooxi-propilo, nitrato de bencilo, dinitrato de isosorbida, y N-[2-(Nitrooxi)etil]-3-piridinacarboxamida, 2-nitro-5-nitrooximetil-furano, y éter de bis-(2-nitrooxietilo).
- 20 5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la al menos una molécula orgánica de la fórmula (I), o una sal de esta se selecciona de entre 3-nitrooxipropanol, 5-nitrooxi-pentanonitrilo, 5-nitrooxi-pentano, propionato de 3-nitro-oxipropilo, 1,3-bis-nitrooxipropano, 1,4-bis-nitrooxibutano, 1,5-bis-nitrooxipentano, benzoato de 3-nitrooxi-propilo, hexanoato de 3-nitrooxi-propilo, 5-nitrooxi-hexanoato de 3-nitrooxi-propilo, dinitrato de isosorbida, y N-[2-(Nitrooxi)etil]-3-piridinacarboxamida, y éter de bis-(2-nitrooxietilo).
- 25 6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la al menos una molécula orgánica de la fórmula (I) es una mezcla de 3-nitrooxi propanol y 1,3-bis-nitrooxipropano.
- 30 7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la al menos una molécula orgánica de la fórmula (I), o una sal de esta se combina con al menos una sustancia activa adicional seleccionada de entre el grupo que consiste en disulfuro de dialilo, aceite de ajo, isotiocianato de alilo, ácido desoxicólico, ácido quenodesoxicólico y los derivados de estos.
- 35 8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el animal rumiante se selecciona de entre el grupo que consiste en: reses, cabras, ovejas, jirafas, bisontes americanos, bisontes europeos, yaks, búfalos de agua, venados, camellos, alpacas, llamas, ñus, antílopes, antílopes americanos y nilgós
9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la producción de metano en rumiantes calculada en litros por kilogramo de ingesta de materia seca se reduce en al menos un 10 % cuando se mide en cámaras metabólicas.
- 40 10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la cantidad del al menos un compuesto activo como se define en la fórmula (I) administrado al animal rumiante es de 1 mg a 10 g por kg de pienso.
11. Una composición de pienso de rumiantes o aditivo de pienso que comprende al menos una molécula orgánica de la fórmula (I) según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6.
- 45 12. La composición de pienso de rumiantes o aditivo de pienso según la reivindicación 11 que comprende además un ingrediente seleccionado de entre el grupo que consiste en carbonatos de calcio, electrolitos, proteínas, harina de soja, trigo, almidón, harina de girasol, maíz, harina carne y huesos, aminoácidos, grasa animal, vitaminas y minerales traza.

13. La composición de la reivindicación 11 que es una premezcla mineral, una premezcla de vitaminas que incluye vitaminas y minerales o un bolo.

14. Un método para reducir la producción de metano que emana de las actividades digestivas de rumiantes que comprende administrar por vía oral al animal una cantidad suficiente de al menos una molécula orgánica sustituida en cualquier posición con al menos un grupo nitrooxi, o una sal de esta como se define por la fórmula (I),



fórmula (I)

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

donde

a está comprendido entre 1 y 25,

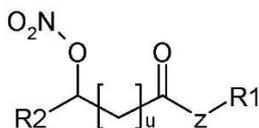
10 b está comprendido entre 2 y 51,

d está comprendido entre 0 y 8,

e está comprendido entre 0 y 5,

g está comprendido entre 0 y 3,

donde ácido nitrooxi alcanoico, y/o derivados de este tal como se definen por la fórmula (II) se excluyen



fórmula (II)

15 donde

u está comprendido entre 0 y 23 y, donde, si $u \neq 0$, la cadena de carbono es una cadena de carbono lineal, cíclica, o lineal ramificada o alifática cíclica que puede ser mono o poliinsaturada en cualquier forma isomérica,

20 Z es independientemente O, NH o N-R3, donde, si $R1 \neq H$, Z-R1, representa un éster o un derivado de amina secundaria,

R1 es independientemente, hidrógeno o una cadena lineal, cíclica, o ramificada saturada de un grupo alquilo o alqueno que contiene de 1 a 10 átomos de carbono,

R2 es independientemente, hidrógeno o una cadena lineal, cíclica, o ramificada saturada de un grupo alquilo o alqueno que contiene de 1 a 23 átomos de carbono,

25 R3 es independientemente, hidrógeno o una cadena lineal, cíclica, o ramificada saturada de un grupo alquilo o alqueno que contiene de 1 a 10 átomos de carbono,

15. Un método según la reivindicación 14, donde la al menos una molécula orgánica se administra al animal en combinación con al menos una sustancia activa adicional seleccionada de entre el grupo que consiste en disulfuro de dialilo, aceite de ajo, isotiocianato de alilo, ácido desoxicólico, ácido quenodesoxicólico y derivados de estos.

30 16. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15, donde el animal rumiante se selecciona de entre el grupo que consiste en: reses, cabras, ovejas, jirafas, bisontes americanos, bisontes europeos, yaks, búfalos de agua, venados, camellos, alpacas, llamas, ñus, antílopes, antílopes americanos y nilgós.

35 17. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, donde la cantidad de la al menos una molécula orgánica como se define en la fórmula (I) administrada al animal rumiante es de 1 mg a 10 g por kg de pienso.

18. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, donde la producción de metano en rumiantes calculada en litros por kilogramo de ingesta de materia seca se reduce en al menos un 10 % cuando se mide en cámaras metabólicas.