

MINISTERIO DE INDUSTRIA  
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

19 ES	11	NUMERO	10 A1
	21	458.939	
	22	FECHA DE PRESENTACION	
		19-5-77	

PATENTE DE INVENCION

40 PRIORIDADES:	42 FECHA	43 PAIS
41 NUMERO		
20675/76	19 de Mayo de 1.976	Inglaterra

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	A23K; C12D	

64 TITULO DE LA INVENCION
PROCEDIMIENTO DE OBTENCION DE COMPOSICIONES PARA ECONOMIZAR Y MEJORAR LA CRIANZA DE ANIMALES.

71 SOLICITANTE (S)
IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED, entidad británica

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
Imperial Chemical House, Millbank, Londres SW1P 3JF, Inglaterra.

72 INVENTOR (ES)
DAVID HUW DAVIES, RICHARD JOHN ERNILL Y GEOFFREY LIGHTFOOT.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
D. JOSE MIGUEL GOMEZ-ACEBO Y POMBO

5 La presente invención se refiere a un método de obtención de composiciones para ser usadas en la práctica de la ganadería para mejorar el ritmo de crecimiento del ganado así como la eficiencia en el uso de alimentos para animales.

10 Las composiciones obtenidas según la invención son útiles, para practicarse en ganadería, mediante administración por vía oral a animales domésticos productores de carne, por ejemplo pollos, pavos, patos, gansos, cerdos, ovinos, vacunos o conejos, de dichas composiciones que comprenden un compuesto del grupo ácido aureólico.

Por definición, un compuesto del grupo ácido aureólico, tal como se usa la expresión en esta especificación incluye:

- 15 (1) ácido aureólico, descrito por Grundy y otros en Antibióticos y Quimioterapia, volumen 3, páginas 12-15 (1.953), y por Philip y otros en el mismo, páginas 1218, también descrito como LA 7017, por Sensi y otros en el volumen 8, página 241 (1.958), y como mitramicina en Estados Unidos, donde también se describe la separación en tres formas, 20 identificadas como mitramicinas A, B y C;
- (2) una mezcla de dos cualesquiera, o de las tres mitramicinas A, B y C;
- 25 (3) aburamicinas A, B, C y D, descritas por Nishimura y otros en Diario de Antibióticos (Tokio), Series A10, páginas 205 (1.957), de las cuales A, B y D también han sido descritas como cromomicinas A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> y A<sub>4</sub> por Shibata y otros en el mismo, Series B<sub>13</sub>, páginas 1 (1.960).

- (4) una mezcla de dos cualesquiera o más aburamicinas A, B, C y D;
- 5 (5) una mezcla de dos cualesquiera, o de las tres cromomicinas A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub> y A<sub>4</sub>, incluso las descritas como SK 229 por Yoshida, Reporte Anual de los Laboratorios de Investigación Shionogi, volumen 15, página 212 (1.965) y como M5-18903 por Gale y otros, Anuario de Antibióticos, página 489 (1.958);
- 10 (6) olivomicinas A, B, C y D, descritas por Gauze y otros, Antibióticos, volumen 7, páginas 34 (1.962) y por Braznihkova en el mismo, página 39;
- (7) una mezcla de dos cualesquiera o más de las olivomicinas A, B, C y D, incluso las descritas como NSC A-649 por Chmitz y otros, Antibióticos y Quimioterapia, volumen 10, página 740 (1.960);
- 15 (8) los antibióticos 232, 2014, 7193 y 11296, descritos por Ukhlina y otros, Microbiología, volumen 34, página 147 (1.965);
- (9) un compuesto único, o una mezcla de compuestos, obtenida de la fermentación de *Streptomyces pilosus*, NCIB 11238;
- 20 (10) variamicina, descrita por Zhdanovich y otros. Química de Compuestos Naturales, volumen 7, página 625 (1.971);
- 25 (11) una sal de amonio, una sal metálica alcalina, una sal metálica alcalinotérrica o una sal metálica de transición, complejo o quelato de un compuesto o mezcla de compuestos descritos en los numerales (1) a (10) precedentes, por ejemplo sales de amonio, sodio, potasio, litio, magnesio, calcio, bario y cobre.

El compuesto del grupo ácido aureólico se administra a los animales preferiblemente por vía oral como suplemento de la dieta, es decir, mezclado con alimento sólido, disuelto en el agua de beber, o bien, tratándose de animales jóvenes tales como lechones o terneros, disueltos en leche entera o desnatada. En general conviene administrar el compuesto mezclado con la dieta sólida normal, nutritivamente equilibrada, de los animales, y dicho alimento reforzado deberá contener preferiblemente entre 0,0001% peso/peso (1 g por tonelada) y 0,005% peso/peso (50 g por tonelada) del compuesto. Se podrá alimentar a los animales con dicho alimento reforzado durante todo el período de crecimiento, o sólo una parte de dicho período, por ejemplo al principio, y/o hasta el período previo a la matanza. El aumento del ritmo de crecimiento logrado mediante las composiciones obtenidas según la invención, permite lograr el peso de mercado o peso de matanza de los animales en un período más corto de desarrollo que el normal, o producir animales más pesados al cabo del período normal de desarrollo.

A los niveles óptimos de inclusión del compuesto promotor del crecimiento no se observan indicios de efecto tóxico alguno.

Los compuestos preferidos del grupo ácido aureólico para su uso en el procedimiento de la presente invención son las sales de sodio y de magnesio, quelatos o complejos de mitramicina A, y una mezcla de mitramicinas.

El procedimiento de la invención comprende dispersar, en forma homogénea, un compuesto del grupo ácido aureólico en un diluyente o portador atóxico, comestible, líquido o sólido.

Un diluyente o portador líquido apropiado es, por ejemplo, el agua de beber o la leche entera o desnatada.

5 Un diluyente o portador sólido apropiado, atóxico, comestible, puede ser, por ejemplo, un alimento para animales nutritivamente balanceado, tal como un alimento convencional normal para pollos parrilleros consistente de grano molido y subproductos graníferos y proteína animal, reforzado con vitaminas y minerales; un alimento normal en venta en el comercio, para el engorde o acabado de cerdos, u otro alimento convencional para animales; o puede ser un diluyente o portador sólido 10 inerte sin valor nutritivo; por ejemplo caolín, talco, carbonato de calcio, tierra de batán, arcilla de Acapulco, conchilla de ostras o piedra caliza molidas; o bien, puede ser almidón o lactosa.

15 La composición obtenida según la invención puede adoptar la forma de un alimento reforzado apropiado para la alimentación directa de los animales, en cuyo caso deberá contener preferiblemente entre 0,0001% peso/peso y 0,005% peso/peso de un compuesto del grupo ácido aureólico mezclado con 20 un alimento nutritivamente equilibrado para animales; o bien podrá ser en forma de una mezcla concentrada ya preparada, para ser diluida con un alimento convencional para animales a fin de producir un alimento reforzado apropiado para la alimentación directa de los animales; en cuyo caso, dicha mezcla deberá 25 contener preferiblemente entre 0,005% y 50% peso/peso de un compuesto del grupo ácido aureólico, mezclado con un alimento para animales nutritivamente balanceado, o con un diluyente sólido inerte sin valor nutritivo, tal como piedra caliza molida, almidón o lactosa. Dicha mezcla puede diluirse en forma convencional, preferiblemente en serie, en dos o más etapas, para 30 asegurar una mezcla pareja.

Conforme a otra característica de la invención, se provee un proceso para la fabricación de una mezcla de mitramicinas que consiste en cultivar una cepa de Streptomyces pilosus productora de mitramicina en un medio nutriente acuoso que contenga fuentes de carbono y nitrógeno asimilables en condiciones aeróbicas, en agitación, a una temperatura entre los 15°C y los 45°C, filtrando el cultivo y aislando la fracción ácida del filtrado por medios convencionales.

Una cepa apropiada de S. pilosus productora de mitramicina es la depositada en la Colección Nacional de Bacterias Industriales, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentos, Estación de Investigaciones Torry, 135 Abbey Road, Aberdeen AB9 8DG, Escocia, bajo la referencia NCIB 11238. La descripción de esta cepa de S. pilosus es la siguiente:

A. Morfología (levadura-malta-agar, 25°C, 8 días)

El micelio aéreo muestra ramificación simple. Cadenas de esporas largas (más de 10 esporas) en espirales (spira). Superficie de las esporas (en microscopio electrónico), pilosa.

B. Apariencia del crecimiento después de 12 días a 25°C en;

1. Levadura-malta-agar

Colonia típica de estreptomicetos. Micelio aéreo blanco al principio, tornándose gris a medida que progresa la esporulación (Serie gris). Esporulación profusa. Substrato del micelio marrón. Sin pigmento difusible.

2. Almidón-sales-agar

Micelio aéreo gris pálido, escasa esporulación. Substrato del micelio color canela. Sin pigmento difusible.

5

3. Glucosa-asparagina-agar

Micelio aéreo gris, esporulación profusa. Substrato del micelio gris. Sin pigmento difusible.

4. Glicerol-asparagina-agar

10

Micelio aéreo gris, esporulación profusa. Substrato del micelio color canela. Sin pigmento difusible.

5. Harina de avena-agar

Sin micelio aéreo. Substrato del micelio blanco. Sin pigmento difusible.

6. Sucrosa-nitrato-agar

15

Micelio aéreo gris pálido. Buena esporulación. Substrato del micelio color canela grisáceo. Sin pigmento difusible.

7. Tirosina-agar

20

Micelio aéreo gris pálido. Buena esporulación. Substrato del micelio gris. Sin pigmento difusible.

8. Nutriente-agar

Micelio aéreo blanco. Poca esporulación.

Substrato del micelio color canela, tornándose casi negro. Sin pigmento difusible.

9. Hierro-peptona-agar

5 Micelio aéreo blanco grisáceo. Escasa esporulación. Substrato del micelio marrón, tornándose negro. Ligero pigmento difusible marrón (Melanina +, pero débil).

10. Pigmento melanóideo-agar

Sin micelio aéreo. Substrato del micelio marrón oscuro. Ligero pigmento difusible marrón (melanina +, pero débil).

C. Propiedades fisiológicas

Utilización como única fuente de carbono  
(en agar Fridham/Gottlieb) de:

15	glucosa	+	
	xilosa	+	
	arabinosa	+	
	ramnosa	+	
	fructosa	+	
20	galactosa	+	
	rafinosa	-	
	manitol	+	
	inositol	+	
	salicina	<u>+</u>	(muy débil)
	sucrosa	<u>+</u>	(débil)

25 Hidrólisis de:

gelatina +

almidón +

caseína (leche-agar) +

Acción en leche tornasolada

5

Peptonización y producción de ácido. Sin solidificación.

Temperaturas de crecimiento

Crecimiento en levadura-malta-agar después de 14 días a:

10

2º	5º	10º	15º	20º	25º	30º	37º	45º	55º
-	-	±	+	+	+	+	+	+	-

15

En el proceso de la presente invención, una fuente apropiada de carbono asimilable es, por ejemplo, un alcohol polihídrico, tal como glicerol, glucosa, xilosa, arabinosa, ramnosa, fructosa, galactosa, manitol o inositol, siendo una fuente de carbono preferida el glicerol. El glicerol se incorpora convenientemente al medio a razón de un 2% a un 5% peso/volumen.

20

Una fuente apropiada de nitrógeno asimilable es, por ejemplo, peptona, la que se incorpora convenientemente a razón de un 0,5% a un 2% peso/volumen.

25

El medio nutriente contiene, además, cantidades más pequeñas de otros elementos, tales como fósforo, por ejemplo en forma de ortofosfato ácido potásico o fosfato damónico; magnesio, por ejemplo en forma de sulfato de magnesio o carbonato de magnesio; azufre, por ejemplo en forma de una sal de sulfato; potasio, por ejemplo en forma de cloruro

de potasio, carbonato de potasio, u ortofosfato ácido potásico; y vestigios de sales de elementos tales como cobre, zinc, hierro, manganeso y molibdeno.

5 Una temperatura apropiada para la fermentación es 32°C, y el producto ácido puede extractarse del filtrado del cultivo por medios convencionales, por ejemplo, extractando el filtrado con un solvente orgánico inmisible en agua, de pH neutral o básico para quitar productos neutrales y básicos no deseados, acidulando la fase acuosa y extrayendo el producto ácido requerido con un solvente orgánico inmisible en agua.

10 De acuerdo con otra característica de la invención, se provee un proceso mejorado para purificar el producto ácido que consiste en convertirlo en el quelato de magnesio o la sal del mismo haciendo entrar en contacto a una solución del producto ácido en un solvente orgánico inmisible en agua, con silicato de magnesio.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención pero no son excluyentes:

20 Ejemplo 1

25 Se cultivó Streptomyces pilosus NCIB 11238 como cultivo de ladera en cuatro laderas de un medio de tripton-levadura-agar en semilleros a 32°C durante 7 días. Se rasparon el micelio y las esporas de cada ladera con agua esterilizada (100 ml) poniendo las paspaduras en un frasco de 2 litros que contenía 1 litro de un medio preparado según la siguiente fórmula:

	Glicerol	5,0% peso/volumen
	Peptona (Difco-marca registrada)	0,5% " "
	Carbonato de calcio	0,1% " "
	Ortofosfato dihidrógeno potásico	0,024%" "
5	Sulfato de magnesio $.7H_2O$	0,02% " "
	Concentrado de elementos menores	0,1% " "
	Agua desionizada hasta	100

El concentrado de elementos menores se preparó del siguiente modo:

10	Sulfato ferroso $.7H_2O$	0,1% peso/volumen
	Sulfato cúprico $.5H_2O$	0,015% " "
	Sulfato de zinc $.7H_2O$	0,1% " "
	Sulfato de manganeso $.4H_2O$	0,01% " "
	Molibdato de potasio	0,01% " "
15	Agua desionizada hasta	100

Se agregaron las sales a una parte del agua desionizada, y se aciduló la mezcla con un volumen suficiente de ácido clorhídrico concentrado con agua desionizada. Luego se esterilizó la solución en autoclave a  $1,05461 \text{ Kg/cm}^2$  durante media hora.

Se agitaron los cuatro frascos de 2 litros así preparados a  $32^\circ\text{C}$  durante 2 días en un agitador orbital. Luego se combinó el contenido de los cuatro frascos para inocular un fermentador que contenía 80 litros de un medio preparado de acuerdo con la siguiente fórmula:

	Glicerol	5,0% peso/volumen
	Carbonato de calcio	0,1% " "
	Ortofosfato ácido potásico	0,024% " "

Sulfato de magnesio $.7H_2O$		0,2%	peso/volumen
Concentrado de elementos menores (como se describe precedentemente)		0,1%	" "
Peptona (Difco-marca registrada)		0,5%	" "
Agua desionizada	hasta	100	

5 y se esterilizó en autoclave a  $1,05461 \text{ Kg/cm}^2$  durante media hora. El contenido del fermentador se agitó a  $32^\circ\text{C}$  durante 10 45 horas usando una turbina con 6 álabes chatos que giraban a 260 r.p.m. y aireando a razón de 40 litros por minuto. Se agregó glicol de polipropileno a medida que resultaba necesario para suprimir la formación de espuma. El caldo de fermentación se filtró, y se extractó el filtrado ( $\text{pH} \sim 7,3$ ) con acetato de etilo (25l.), el que luego fué desechado. Se ajustó el pH de la fase acuosa a 3,5 con ácido clorhídrico 5N y se extractó con acetato de etilo (2 x 25 l.). Se combinaron 15 los extractos de acetato de etilo, se secaron con sulfato de sodio y se filtraron, y luego se concentró el filtrado, a presión reducida, a un volumen de 1 litro.

20 Del concentrado puede obtenerse el producto requerido, por cualquiera de los dos procedimientos que siguen:

A. Se lavó el concentrado de acetato de etilo con una solución diluída de bicarbonato de sodio (500 ml de agua con una cantidad suficiente de solución saturada de bicarbonato de sodio para dar un pH de 9 a 10). Se separó la 25 fase acuosa y se lavó con cloroformo ( 1 l.), el que fué desechado. Luego se ajustó el pH de la fase acuosa a 3,5 mediante el agregado de ácido clorhídrico diluído, se lavó con éter dietílico (2 x 1 l.), el que fué desechado, y se extractó con acetato de etilo (2 x 1 l.). Se combinaron los extractos de acetato de etilo, se secaron con sulfato de sodio y se filtraron; 30

el filtrado se evaporó hasta la sequedad y el residuo se trituró con éter dietílico para obtener una mezcla cruda de mitramicinas en forma de un sólido marrón amarillento.

5 B. Se evaporó el concentrado de acetato de etilo hasta la sequedad para formar una goma cruda. Se disolvió la goma (11 g) en metanol y se adsorbió la solución sobre diatomita (unos 2 g). Se evaporó el solvente y el material seco se aplicó en la parte superior de una columna de diatomita (40 x 6,5 cm) completada con cloroformo. Se eluyó la columna con cloroformo y se recogieron fracciones de 15 ml. Se examinaron las fracciones por cromatografía de capas delgadas sobre placa de gel de sílice Merck 254, eluyendo con una mezcla de cloroformo/metanol/98% v/v de ácido fórmico en una proporción de 84:8:8 por volumen, para determinar la presencia de los productos de mitramicina requeridos; y se combinaron fracciones de 50 a 250 que contenían este producto, luego se evaporaron hasta la sequedad para obtener una mezcla cruda de mitramicinas en forma de sólido marrón amarillento (1,9 g).

#### Ejemplo 2

20 Se aplicó una solución de la mezcla cruda de mitramicinas obtenida en el ejemplo 1 (3,4 g) en metanol acuoso a la parte superior de una columna previamente hinchada (28 x 5 cm) de dextran entrecruzado (Sephadex G-25 - marca registrada), y se eluyó la columna con agua. La mitramicina descende por la columna en forma de una banda amarillo-verdosa en rápido movimiento, y se recoge la fracción apropiada del eluyente. Se puede usar uno de los siguientes métodos, indistintamente,

A. Se liofiliza el eluyente para obtener

mitramicinas mezcladas en forma de un sólido liofilizado de color amarillo (2,5 g), o bien:

5 B. Se ajusta el pH del eluyente a 3,5 con ácido clorhídrico diluido y se extracta con acetato de etilo, se seca el extracto y se evapora hasta la sequedad para obtener mitromicinas mezcladas, en forma de polvo amarillo (2,3 g), p.f. 169-172°C.

10 Las mitramicinas así obtenidas pueden con vertirse en un quelato de magnesio del componente principal, como sigue:

15 Se agregó 6 g de silicato de magnesio "Florisil" (marca registrada) a una solución de mitramicinas mezcladas (400 mg) en acetato de etilo y luego se evaporó este último. Se aplicó el "Florisil" conteniendo las mitramicinas mezcladas adsorbidas a la parte superior de una columna (40 cm x 2 cm) rellena de "Florisil" y se eluyó la columna sucesivamente con:

- 20
- i) acetato de etilo,
  - ii) 5% v/v metanol en acetato de etilo,
  - iii) 10% v/v metanol en acetato de etilo,
  - iv) 15% v/v metanol en acetato de etilo.

25 Se combinaron las fracciones iii y iv, se evaporaron los solventes, y se cristalizó el residuo a partir de metanol/acetato de etilo para obtener un quelato de magnesio en forma de cristales amarillos, p.f. 210-217°C (descomposición),  $[\alpha]_D^{23} = +85^\circ$  (C = 0,5 en metanol). Análisis encontrado, C = 56,0, H = 7,2. Calculado para  $(C_{52}H_{75}O_{24})_2 \cdot Mg \cdot 2H_2O$ , C = 56,0, H = 7,0%. Estos datos concuerdan substan-



5

nocido para el crecimiento de las aves, penicilina o nitrovina, como control positivo. Al cabo del período de prueba se determinó el peso medio por pollo en el grupo de control y en cada grupo del ensayo, y se calculó el porcentaje de aumento de peso para cada grupo del ensayo, comparado con el grupo de control. Se obtuvieron los siguientes resultados:

10

Dieta	Peso final medio por pollo (g)	% efecto v. control
Dieta básica - control	38,15	-
Dieta básica + penicilina 25 ppm	42,57 $\mp$	11,6
Dieta básica + nitrovina 10 ppm	42,99	12,7
Dieta básica + mitramicinas mezcladas 25 ppm	48,12 $\mp$	26,1
Dieta básica + mitramicinas mezcladas 10 ppm	46,12 $\mp$	20,9

$\mp$  Significativo a nivel  $p < 0,001$

#### Ejemplo 5

15

En otro ensayo de crecimiento se repitió el procedimiento descrito en el ejemplo 4. En este caso se expresa el peso como peso total medio de una jaula de 20 pollos. Se obtuvieron los siguientes resultados:

20

Dieta	Peso final medio 20 pollos (g)	% efecto v. control
Dieta básica - control	740	-
Dieta básica + penicilina 25 ppm	876	18,25
Dieta básica + nitrovina 10 ppm	826	11,6
Dieta básica + mitramicinas mezcladas 25 ppm	984	32,8

Dieta	Peso final medio 20 pollos (g)	% efecto v. control
Dieta básica + mitramicinas mez- cladas 10 ppm	926	24,6
Dieta básica + mitramicinas mez- cladas 5 ppm	825	11,5
Dieta básica + mitramicinas mez- cladas 2,5 ppm	792	7,0

5 Ejemplo 6

En otro ensayo de crecimiento se repitió el procedimiento descrito en el ejemplo 5, pero en este caso se formaron pellas de todos los alimentos mediante un sencillo proceso de compresión. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Dieta	Peso final medio 20 pollos (g)	% efecto v. control
Dieta básica - control	774	-
Dieta básica + mitramicinas mez- cladas 25 ppm	1063	37,2
Dieta básica + mitramicinas mez- cladas 10 ppm	1047	35,3
Dieta básica + mitramicinas mez- cladas 5 ppm	920	18,9
15 Dieta básica + mitramicinas mez- cladas 2,5 ppm	856	10,4

15 Ejemplo 7

Se repitió el procedimiento descrito en el ejemplo 4 usando las mitramicinas mezcladas obtenidas mediante el cultivo de Streptomyces argillaceus A.T.C.C. 12956 por un método conocido, y se obtuvieron los siguientes resulta-  
20 dos:

	Dieta	Peso final medio por pollo (g)	% efecto v. control
	Dieta básica - control	40,1	-
	Dieta básica + penicilina 25 ppm	47,6	18,8
5	Dieta básica + nitrovina 10 ppm	45,2	12,9
	Dieta básica + mitramicinas mez- cladas 25 ppm	46,4	15,9

### Ejemplo 8

Se repitió el procedimiento descrito en el ejemplo 4 usando el quelato de magnesio descrito al final del ejemplo 2 y se obtuvieron los siguientes resultados:

	Dieta	Peso final medio por pollo (g)	% efecto v. control
	Dieta básica - control	41,30	-
	Dieta básica - penicilina 25 ppm	47,95	16,1 *
	Dieta básica + nitrovina 10 ppm	45,67	10,6 *
	Dieta básica + quelato de magne- sio 10 ppm	49,65 *	20,2 *
15	Dieta básica + quelato de magne- sio 5 ppm	47,97 *	16,2 *
	Dieta básica + quelato de magne- sio 2,5 ppm	43,65 **	5,7 **

\*  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,01$

### Ejemplo 9

20

Se repitió el procedimiento descrito en el ejemplo 4 usando el quelato de magnesio de mitramicina A obtenido por un método conocido de la fermentación de S. argillaceus A.T.C.C. 12956, y se obtuvieron los siguientes resultados:

Dieta	Peso final medio por pollo (g)	% efecto v. control
Dieta básica - control	41,30	-
Dieta básica + penicilina 25 ppm	47,95 *	16,1
Dieta básica + nitrovina 10 ppm	45,67 *	10,6 *
5 Dieta básica + quelato de magnesio 10 ppm	48,69 *	17,9 *
Dieta básica + quelato de magnesio 5 ppm	46,38 *	12,3 *
10 Dieta básica + quelato de magnesio 2,5 ppm	43,75 **	5,9 **

P < 0,001;      P < 0,01

#### Ejemplo 10

15 Se repitió el procedimiento descrito en el ejemplo 4 usando 4 jaulas, cada una de 30 pollos machos de descarte, prolongando el ensayo a 4 semanas. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Dieta	Peso final medio por pollo (g)	Indice de conversión de alimentos
Dieta básica - control	329	1.876
Dieta básica + nitrovina 10 ppm	339	1.800 **
20 Dieta básica + mitracinas mez- cladas 10 ppm	360 *	1.782 **
Dieta básica + mitramicinas mez- cladas 5 ppm	360 *	1.789 **

\* significativo al nivel de  $p < 0,01$

\*\* significativo al nivel de  $p < 0,001$ .

Ejemplo 11

Se distribuyeron 72 lechones de un peso aproximado de 20 Kg cada uno, entre 8 grupos iguales de tratamiento de 9 lechones cada uno, sobre la base del sexo y de peso en vivo. Se asignó a cada grupo de tratamiento una dieta distinta, y se alimentó individualmente a cada animal en cada grupo con su correspondiente alimento, pesado con exactitud de acuerdo con una escala de alimentación en base al peso en vivo, ajustado semanalmente. Al final de un período de ensayo de 9 semanas se determinaron el aumento diario de peso vivo en gramos (ADPVG) y el índice de conversión de alimentos (ICA - la relación de Kg de alimento por Kg de aumento de peso vivo) para cada grupo. Se obtuvieron los siguientes resultados:

	<u>Dieta</u>	<u>ADPVG</u>	<u>ICA</u>
15	<u>Dietas con bajo contenido de cobre</u>		
	Dieta básica - control	522,9	2,564
	Dieta básica + nitrovina 10 ppm	567,0	2,381
	Dieta básica + carbadox 20 ppm	630,6 <sup>⊠</sup>	2,292
	Dieta básica + mitramicinas mezcladas 25 ppm	640,2 <sup>⊠⊠</sup>	2,201 <sup>⊠</sup>
20	<u>Dieta</u>	<u>ADPVG</u>	<u>ICA</u>
	<u>Dietas con alto contenido de cobre</u>		
	Dieta básica - control	575,2	2,349
	Dieta básica + nitrovina 10 ppm	579,2	2,308
	Dieta básica + carbadox 20 ppm	672,7 <sup>⊠⊠</sup>	2,184 <sup>⊠</sup>
25	Dieta básica + mitramicinas mezcladas 25 ppm	612,8 <sup>⊠</sup>	2,245 <sup>⊠</sup>

⊠ - significativo al nivel  $p < 0,05$

⊠⊠ - significativo al nivel  $p < 0,01$

Ejemplo 12

Se repitió el procedimiento descrito en el ejemplo 4 usando cromomicina A<sub>3</sub> suministrada por Takeda Chemical Industries Ltd., de Osaka, Japón, en lugar de las mitramicinas mezcladas. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Dieta	Peso final medio por pollo (g)	% efecto v.control
Dieta básica - control	41,46	-
Dieta básica + penicilina 25 ppm	46,73 <sup>⊠</sup>	12,7
Dieta básica + nitrovina 10 ppm	45,46 <sup>⊠</sup>	9,7
Dieta básica + cromomicina A <sub>3</sub> 10 ppm	43,68 <sup>⊠⊠⊠</sup>	5,4
Dieta básica + cromomicina A <sub>3</sub> 5 ppm	44,51 <sup>⊠⊠</sup>	7,3

⊠ - significativo al nivel  $p < 0,001$

⊠⊠ - significativo al nivel  $p < 0,01$

⊠⊠⊠ - significativo al nivel  $p < 0,05$

Ejemplo 13

Se disolvió el quelato de magnesio cristalino (4,2 g) del ejemplo 2 en agua (100 ml) y se ajustó el pH a 3,0 agregando cuidadosamente ácido clorhídrico 0,1 N. Luego se extrajo la solución acidulada con acetato de etilo (2 x 100 ml), se secó el extracto (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y se evaporó el solvente para obtener una goma amarilla. Al ser triturada con éter la goma dió un polvo amarillo (2,5 g), el que se cristalizó a partir de acetato de etilo y se secó a 100°C bajo alto vacío para obtener un material, p.f. 173-176°C, idéntico a la mitramicina A por espectroscopía infrarroja y r.m.n. y cromatografía lí-

quida a alta presión.

#### Ejemplo 14

5 Se agitó un litro de caldo de fermentación obtenido como se describe en el ejemplo 1 con solución de cloruro de sodio al 20%, se ajustó el pH a 3,5 y se extrac-  
tó la mezcla con quetona etilo metilo (2 x 300 ml). Se combi-  
naron los extractos, se secaron, se concentraron a 10 ml y se  
extractaron nuevamente con solución acuosa saturada de bicar-  
bonato de sodio (2 ml). Luego se trató la fase acuosa con me-  
10 tanol (5 ml) obteniendo un precipitado fino de sal sódica de  
mitramicina (30 mg).

#### Ejemplo 15

15 Pueden fabricarse mezclas preparadas apro-  
piadas para diluir con un alimento animal incorporando 1, 5,  
10, 25 ó 50 g de mitramicinas mezcladas en un alimento normal  
para pollos parrilleros que contenga maíz molido y harina de  
pescado, agregando lisina, metionina, vitaminas y minerales,  
de manera que el peso final sea de 500 g.

20 Asimismo pueden fabricarse otras mezclas  
preparadas reemplazando las mitramicinas mezcladas por cual-  
quier otro compuesto del grupo ácido aureólico.

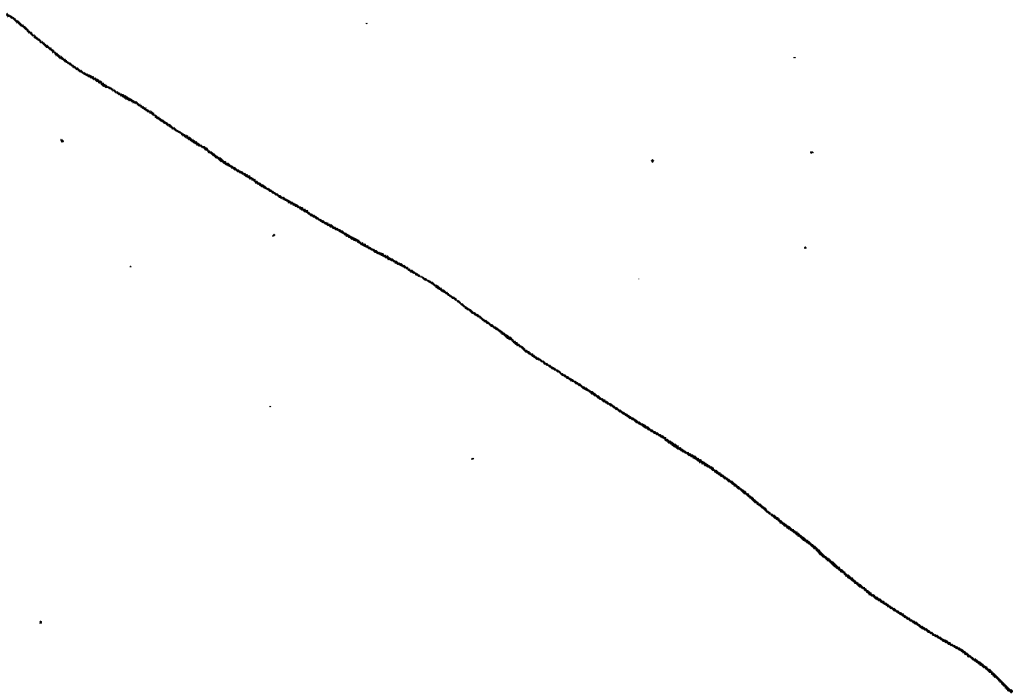
#### Ejemplo 16

25 Pueden fabricarse mezclas preparadas apro-  
piadas para diluir con alimentos para animales por el proceso  
descrito en el ejemplo 15, usando piedra caliza molida en lu-  
gar del alimento normal para pollos parrilleros.

Ejemplo 17

Puede obtenerse un alimento apropiado para la alimentación directa de las aves mezclando íntimamente 500 g de una mezcla preparada obtenida como se describe en los ejemplos 5 ó 16, con 4,5 Kg de alimento normal para pollos parrilleros y luego mezclando uniformemente la mezcla así obtenida con 995 Kg de alimento normal para pollos parrilleros, para obtener un alimento para aves que contenga 1, 5, 10, 25 ó 50 g de un compuesto del grupo ácido aureólico por tonelada, según la concentración del compuesto en la mezcla preparada usada.

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarse en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental.



REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento de obtención de composiciones para economizar y mejorar la crianza de animales, caracterizado porque se dispersa un compuesto del grupo del ácido aureólico, en un diluyente o vehículo sólido, comestible, no tóxico, en forma homogénea.


2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho diluyente o vehículo es agua de beber, leche entera o leche descremada.

10 3. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el diluyente o vehículo es un alimento para animales nutricionalmente equilibrado.

15 4. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque el alimento para animales nutricionalmente equilibrados es una dieta para pollos asaderos de grano molido y subproductos de grano y proteína animal, suplementada por vitaminas y minerales, una dieta de engorde o acabado para cerdos, comercial, standard u otros alimentos convencionales para animales.

20 5. Procedimiento según la reivindicación 3 ó 4, caracterizado porque se mezcla de 0,0001 a 0,005% p/p del compuesto del grupo del ácido aureólico.

25 6. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque la mezcla se lleva a cabo en forma de premezcla concentrada para su dilución con un alimento convencional para animales, para producir un alimento suplementado



adecuado para la alimentación directa a animales.

5 7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque el diluyente o vehículo sólido, comestible, no tóxico, es un alimento para animales nutricionalmente equilibrado, un diluyente sólido inerte sin valor nutricional, almidón o lactosa.

10 8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque el alimento para animales nutricionalmente equilibrado es una dieta para pollos asaderos convencional, standard, una dieta de engorde o acabado de cerdos, comercial, standard, u otro alimento convencional para animales.

15 9. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque el diluyente sólido inerte sin valor nutricional es caolín, talco, carbonato de calcio, tierra de batán, arcilla de atapulgita, conchas molidas de ostras o caliza molida.

20 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, caracterizado porque se mezcla de 0,005 a 50% p/p del compuesto del grupo del ácido aureólico.

20 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el compuesto del grupo del ácido aureólico es la sal sódica o de magnesio, quelato o complejo de mitramicina A.

25 12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque el compuesto del grupo del ácido aureólico es una mezcla de mitramicinas.

Reg

5 13. Procedimiento para preparar una mezcla de mitramicinas, caracterizado porque comprende cultivar una cepa de Streptomyces pilosus productora de mitramicina, en un medio nutriente acuoso, que contiene fuentes de carbono y nitrógeno asimilables, bajo condiciones aeróbicas agitadas, a una temperatura entre 15 y 45°C; filtrar el cultivo; y aislar la fracción acídica del filtrado.

10 14. Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado porque la cepa de Streptomyces pilosus productora de mitramicina, es la depositada en National Collection of Industrial Bacteria de Escocia con la referencia NCIB 11238.

15 15. Procedimiento según la reivindicación 13 ó 14, caracterizado porque la fuente de carbono asimilable es glicerol, glucosa, xilosa, arabinosa, ramnosa, fructosa, galactosa, manitol o inositol.

16. Procedimiento según la reivindicación 15, caracterizado porque el medio acuoso nutriente contiene de 2 a 5% p/v de glicerol como fuente de carbono asimilable.

20 17. Procedimiento según la reivindicación 14, caracterizado porque el medio acuoso nutriente contiene de 0,5 a 2% p/v de peptona como fuente de nitrógeno asimilable.

25 18. Procedimiento para purificar el producto acídico del proceso reivindicado en la reivindicación 13, caracterizado porque comprende convertirlo a la sal de magnesio, quelato o complejo del mismo, mediante la puesta en contacto de una solución del producto acídico en un disolvente orgánico inmiscible con agua, con silicato de magnesio.

Rg

19. Procedimiento de obtención de composiciones para economizar y mejorar la crianza de animales, tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

5

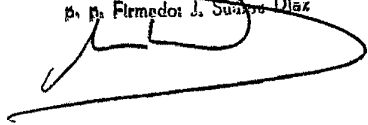
Esta Memoria consta de 27 hojas, escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 19 JUL. 1977

IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED,

M. DE GOMEZ ASEDO Y PONDO

p. p. Firmados J. Suarez Diaz



12