



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 333 573**

② Número de solicitud: 200801145

⑤ Int. Cl.:
A01K 61/00 (2006.01)
A01K 67/033 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **21.04.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **23.02.2010**

Fecha de la concesión: **01.04.2011**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **13.04.2011**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
13.04.2011

⑰ Titular/es: **Universidad de Vigo
Campus Universitario Lagoas - Marcosende
36310 Vigo, Pontevedra, ES**

⑱ Inventor/es: **Beiras García-Sabell, Ricardo y
Bellas Bereijo, Juan Domingo**

⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Procedimiento para la evaluación de la eficacia de compuestos anti-incrustantes o "antifouling" mediante el bioensayo del asentamiento larvario de ascidias.**

㉑ Resumen:

Procedimiento para la evaluación de la eficacia de compuestos anti-incrustantes o "antifouling" mediante el bioensayo del asentamiento larvario de ascidias.

Numerosos compuestos "antifouling" han sido desarrollados para combatir el problema del "fouling". Aunque algunos de estos compuestos, como el TBT, han demostrado una gran eficiencia en el control y prevención del "fouling", su estabilidad ambiental y extrema toxicidad sobre los organismos marinos ha provocado su prohibición. Como consecuencia de la legislación existente es crucial el desarrollo de sustancias "antifouling" alternativas que mantengan la eficiencia del TBT, pero que sean aceptables desde el punto de vista ambiental. La presente invención contribuye al desarrollo de sustancias "antifouling" alternativas, y consiste en un procedimiento para la evaluación toxicológica de compuestos "antifouling" utilizando el bioensayo de asentamiento larvario de ascidias. Este bioensayo se basa en la incubación de larvas de ascidia en recipientes con soluciones de los compuestos "antifouling" durante un periodo de 24 h, al cabo del cual se mide el porcentaje de asentamiento larvario como respuesta biológica.

ES 2 333 573 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la evaluación de la eficacia de compuestos anti-incrustantes o “antifouling” mediante el bioensayo del asentamiento larvario de ascidias.

5 La presente invención se refiere a la utilización de una prueba biológica, el bioensayo del asentamiento larvario de las ascidias, en la evaluación de la eficacia de compuestos anti-incrustantes o “antifouling” utilizados para prevenir el crecimiento no deseado de organismos en la superficie de cascos de barcos y otras estructuras artificiales sumergidas. Este ensayo biológico, de fácil desarrollo en laboratorio y rápida respuesta (48 h), permite comprobar la eficacia de un compuesto “antifouling” antes de su aplicación en el tratamiento de superficies sumergidas en el medio marino.

Sector de la técnica

15 El sector técnico en el que se encuadra la invención se incluye dentro del ámbito de la biología marina y de la ecotoxicología. En concreto, es relativo a las herramientas biológicas de evaluación de la contaminación marina. El bioensayo al que se refiere la invención puede ser utilizado en la evaluación de la eficacia de compuestos “antifouling”.

Estado de la técnica

20 El término “fouling” hace referencia al asentamiento y crecimiento de organismos no deseados en la superficie de estructuras artificiales sumergidas en el mar, y las graves consecuencias económicas de este fenómeno afectan a actividades como la industria pesquera, la naviera, la acuicultura, o los puertos, entre otras. Los compuestos y pinturas “antifouling” se han desarrollado con el propósito de prevenir y controlar el “fouling”, por lo tanto su importancia ecológica y económica es incuestionable. Por ejemplo, se ha estimado que el ahorro en el consumo de fuel, la reducción de la carga de trabajo de la maquinaria de los barcos, o la reducción de los periodos en dique seco, debido a la mejora de la tecnología “antifouling”, representa un ahorro global de aproximadamente 5700 millones de dólares al año para la flota comercial mundial, además de reducir la emisión de gases invernadero en 20 millones de toneladas al año (revisado por Yebra *et al.*, Progress in Organic Coatings, 50, 75-104, 2004).

30 Entre todas las sustancias “antifouling” utilizadas, el tributilestano (TBT, según sus siglas en inglés), introducido entre los años 60 y 70, ha sido el compuesto más eficiente en la reducción y control del “fouling”, llegando a cubrir más del 70% de la flota comercial mundial. Sin embargo, el uso del TBT y demás compuestos organoestánicos, ha sido prohibido por una resolución de la Organización Marítima Internacional (OMI) (Resolución A. 895 21, 25/11/1999), debido a los efectos perjudiciales de estos compuestos derivados de su estabilidad ambiental así como de la extrema toxicidad hacia los organismos marinos (ver revisión de Bryan y Gibbs, En: Newman y McIntosh Eds., Metal Ecotoxicology: Concepts and Applications. Lewis Publishers Inc., Chelsea, pp. 323-353, 1991). Esta resolución, aprobada por la OMI en noviembre de 1999, ha tenido como consecuencia la prohibición global de la aplicación de pinturas basadas en compuestos organoestánicos en los cascos de los barcos desde enero de 2003, y la completa prohibición de la presencia de las pinturas organoestánicas a partir de enero de 2008. El Reglamento 782/2003 del Parlamento Europeo también prohíbe el uso de compuestos organoestánicos en los barcos registrados en la UE con las mismas fechas de aplicación.

45 Como consecuencia de la legislación existente, el desarrollo de compuestos alternativos al TBT ha adquirido una relevancia especial, y se ha dedicado un gran esfuerzo investigador a este sector. La prohibición global de las pinturas “antifouling” basadas en compuestos organoestánicos demanda urgentemente el desarrollo de compuestos aceptables desde el punto de vista ambiental que mantengan la misma eficacia contra el “fouling” que el TBT. Numerosos compuestos han surgido rápidamente en un intento de solucionar este problema, sin embargo, algunos de estos compuestos han sido prohibidos o regulados en Europa debido a su persistencia en el ambiente y su toxicidad sobre organismos marinos (revisado por Konstantinou y Albanis, Environment International, 30, 235-248, 2004), evidenciando la necesidad de realizar procedimientos de evaluación predictiva de riesgo adecuados para este tipo de sustancias. De esta forma, el Parlamento Europeo implementó en mayo de 2000 la Directiva de Productos Biocidas (Directiva 98/8/CE) que establece los requerimientos que un nuevo compuesto biocida debe cumplir antes de ser introducido en el mercado, y se encarga de revisar los biocidas existentes para asegurar que no presenten riesgos inaceptables para el ser humano, los animales o el medio ambiente.

55 Los estados embrionarios y larvarios de invertebrados marinos son más sensibles a los tóxicos que los adultos, y los bioensayos embrio-larvarios, en particular con bivalvos y erizos de mar, han sido utilizados durante décadas en la evaluación y seguimiento de la contaminación marina (revisado por His *et al.*, En: Southward, Tyler y Young, Eds., Advances in Marine Biology vol. 37. London, Academic Press, pp. 1-178, 1999, para bivalvos, y por Kobayashi, En: Cheremisinoff, Ed., Encyclopedia of Environmental Control Technology vol. 9. Houston, Gulf Publ, pp. 539-609, 1995, para erizos de mar). En la actualidad, los bioensayos embriolarvarios con bivalvos y erizos de mar están perfectamente estandarizados, tanto para su uso en laboratorio, incubando los huevos fertilizados en recipientes con muestras ambientales recogidas en las zonas de estudio, como para su uso “*in situ*”, incubando los huevos fertilizados en el sitio de estudio dentro de recipientes que permiten el paso del agua de mar. En ambos casos, la exposición dura hasta que se desarrolla la larva veliger (bivalvos) o pluteus (erizo de mar), transcurrida la cual las larvas son examinadas y las anomalías inducidas por la presencia de sustancias tóxicas son determinadas. Recientemente, los estados embrionarios y larvarios de ascidias han sido también propuestos para su utilización en la evaluación de la contaminación marina (Bellas *et al.*, Water Research, 3, 4613-4622, 2003).

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 representa el porcentaje de asentamiento de larvas de la ascidia *Ciona intestinalis* en presencia de varios tratamientos consistentes en diferentes concentraciones de compuestos “antifouling” mencionados aquí. Los símbolos indican diferentes experimentos

Explicación de la invención

El uso continuado de los compuestos “antifouling” alternativos al TBT en el futuro debe ser considerado cuidadosamente, teniendo además en cuenta que a partir de la prohibición total del uso del TBT en 2008, los niveles ambientales de estos compuestos se incrementarán notablemente. Por lo tanto, la búsqueda de métodos “antifouling” aceptables desde el punto de vista ambiental debe continuar y, para conseguir una solución sostenible al persistente problema del “fouling”, la evaluación de riesgo asociado con el uso de nuevos compuestos debe ser realizado antes de su aprobación, como exige la Directiva de Productos Biocidas. Por otra parte, los nuevos compuestos “antifouling” han de mantener la eficacia del TBT contra los organismos del “fouling”, evitando así su crecimiento en estructuras artificiales sumergidas.

En esta línea de investigación ha trabajado el grupo de ecotoxicología de la Universidad de Vigo, adaptando el uso de los bioensayos con larvas de invertebrados marinos (ascidias) a la evaluación de compuestos “antifouling” teniendo en cuenta las exigencias del Parlamento Europeo. El objetivo de esta invención es proporcionar a la industria marina una herramienta sencilla, de respuesta rápida y ambientalmente relevante, y de coste moderado, para la evaluación de la eficacia de nuevas sustancias “antifouling”.

Las ascidias son invertebrados marinos pertenecientes al Filum Cordados. Normalmente están presentes en densas poblaciones en la zona litoral, desempeñando un importante papel en el ecosistema como organismos filtradores. Además, son muy abundantes en estructuras artificiales sumergidas en los puertos como las boyas o los cascos de barcos. Por lo tanto, son organismos importantes del “fouling”, sujetos a las estrategias “antifouling”.

La presente invención consiste en el desarrollo de un bioensayo del asentamiento larvario de ascidias para ser utilizado en la evaluación de la eficacia de compuestos “antifouling”. Este procedimiento comprende:

- a) La transferencia de un número determinado de larvas recién eclosionadas de ascidia obtenidas por fecundación “*in vitro*” a recipientes con las soluciones experimentales que contengan el compuesto “antifouling” que se quiere evaluar.
- b) La exposición de las larvas a las soluciones experimentales durante 24 h en condiciones óptimas de incubación para estos organismos dentro de una cámara de cultivo en oscuridad.
- c) La eliminación de las soluciones experimentales y lavado de los recipientes con un frasco lavador con agua de mar, con el objetivo de eliminar restos de embriones y larvas no asentadas.
- d) La observación a la lupa del número de larvas asentadas en las paredes y en la base de los recipientes y determinación del porcentaje de asentamiento.

El siguiente ejemplo muestra el modo de realización de la invención. *Ciona intestinalis* es posiblemente la ascidia más conocida y estudiada a nivel mundial y los experimentos descritos a continuación están basados en esta especie. Antes de explicar este ejemplo concreto debe comprenderse que la invención es aplicable a otras especies de invertebrados marinos sésiles componentes del “fouling”, y que los detalles del procedimiento pueden adaptarse fácilmente a las características particulares de las larvas de dichas especies.

Adultos maduros de *C. intestinalis* fueron recogidos en poblaciones naturales de la Ría de Vigo y transportados al Laboratorio de Ecología Marina de la Universidad de Vigo. Los gametos se obtuvieron mediante disección de las ascidias, efectuada de la siguiente forma: después de retirar a los animales de sus tunicas se abrieron por la línea medio ventral para dejar las gónadas y gonoductos al descubierto; a continuación, con una pipeta Pasteur, se recogieron directamente de los gonoductos óvulos maduros y esperma de diferentes especímenes. Los óvulos fueron resuspendidos en vasos de precipitado con agua de mar artificial, a una densidad de 5-10 óvulos/ml, donde se llevó a cabo la fertilización mediante la adición de espermatozoides a una concentración aproximada de 10^7 - 10^8 espermatozoides/ml, agitando cuidadosamente a continuación para distribuir los gametos de forma homogénea. Los huevos fecundados fueron incubados en una cámara de cultivo a una temperatura constante de 20°C durante un periodo de 20 h, momento en el que se produce la eclosión de las larvas de *C. intestinalis*. El cultivo larvario fue filtrado a través de una malla de 150 μ m donde quedaron retenidas las larvas, que fueron resuspendidas de nuevo en un vaso de precipitado con agua de mar artificial a una concentración de 300 larvas/ml. En este momento, entre 25 y 30 larvas fueron transferidas a placas multipocillo de 3 ml (tipo 24-multiwell plate) con 2 ml de solución experimental. En el presente experimento los compuestos ensayados fueron el TBT y el cobre (los dos compuestos más utilizados en las pinturas “antifouling”), y las soluciones experimentales consistieron en 4, 8, 16, 32 y 64 μ g/L para el TBT, y 16, 32, 64, 128 y 256 μ g/L para el cobre, además de un tratamiento control consistente en agua de mar artificial, con un total de 4 réplicas para cada tratamiento. Las larvas fueron incubadas con las soluciones experimentales durante 24 h a 20°C en una cámara de cultivo en oscuridad, en condiciones físico-químicas óptimas para las larvas de *C. intestinalis*. Una vez transcurrido

ES 2 333 573 B1

el periodo de exposición, el contenido de los pocillos fue retirado, y los pocillos fueron lavados con agua de mar artificial para eliminar restos de embriones y larvas no fijadas. A continuación los pocillos fueron observados a la lupa y se determinó el porcentaje de asentamiento. La Figura 1 muestra el porcentaje de asentamiento de las larvas de ascidia después de 24 h de exposición a 4, 8, 16, 32 y 64 $\mu\text{g/L}$ de TBT (Figura 1A) y 16, 32, 64, 128 y 256 $\mu\text{g/L}$ de cobre (Figura 1B). En ambos casos se obtiene una curva dosis respuesta en la que el asentamiento de las larvas de ascidia disminuye al aumentar las concentraciones de los compuestos ensayados. A partir de estos datos, calculamos la concentración efectiva 10 (CE_{10}), es decir, la concentración de tóxico que da lugar a una disminución del 10% en el porcentaje de asentamiento larvario. En el caso del TBT el valor de este parámetro es 4,8 (3,6-6,0) $\mu\text{g/L}$ y para el cobre se obtiene 72,7 (63,0-80,5) $\mu\text{g/L}$. De esta forma tenemos una idea de la capacidad de inhibición del asentamiento de los compuestos ensayados.

Aplicaciones

El bioensayo de asentamiento larvario de ascidias ha sido aplicado con éxito a la evaluación de la eficacia de los dos compuestos “antifouling” más utilizados, el TBT y el cobre. Este bioensayo podría ser utilizado por la industria marina en la evaluación rutinaria o pre-industrial de la eficacia de nuevos biocidas “antifouling”. La invención también es de aplicación a estudios de riesgo ambiental y al seguimiento de la contaminación causada por el uso de pinturas “antifouling” en zonas portuarias tanto industriales como deportivas.

ES 2 333 573 B1

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la evaluación de la eficacia de compuestos “antifouling” que comprende:

5

a) La transferencia de un número determinado de larvas de ascidias a recipientes con unas soluciones que contengan el compuesto “antifouling” que se quiere evaluar.

10

b) La exposición de las larvas a las soluciones experimentales durante 24 h en condiciones óptimas de incubación dentro de una cámara de cultivo en oscuridad.

15

c) La eliminación de las soluciones experimentales, y lavado de los recipientes con un frasco lavador con agua de mar, con el objetivo de eliminar restos de embriones y larvas no asentadas.

d) La observación y recuento a la lupa del número de larvas asentadas en las paredes y en la base de los recipientes y determinación del porcentaje de asentamiento.

2. Un procedimiento según reivindicación 1, **caracterizado** porque la exposición de las larvas a las soluciones experimentales tiene lugar en placas multipocillo de 3 ml (tipo 24-multiwell plate).

20

3. Un procedimiento según reivindicación 1, **caracterizado** porque las larvas utilizadas pertenecen a ascidias solitarias del género *Ciona*.

25

4. Un procedimiento según reivindicaciones 1 a 3, para la evaluación de riesgo ambiental derivado del uso de compuestos “antifouling” actualmente en uso.

30

35

40

45

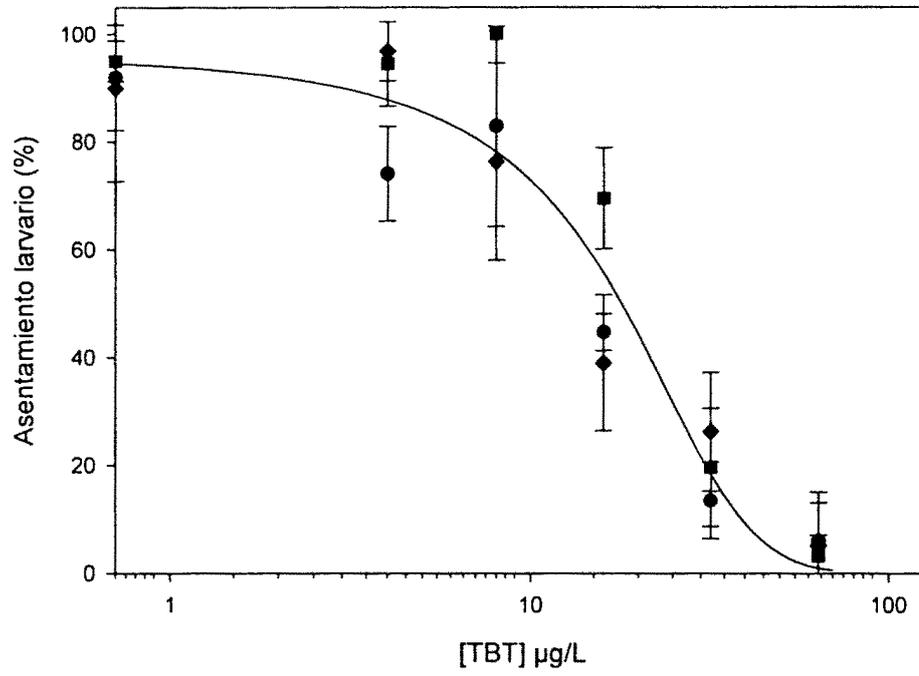
50

55

60

65

A



B

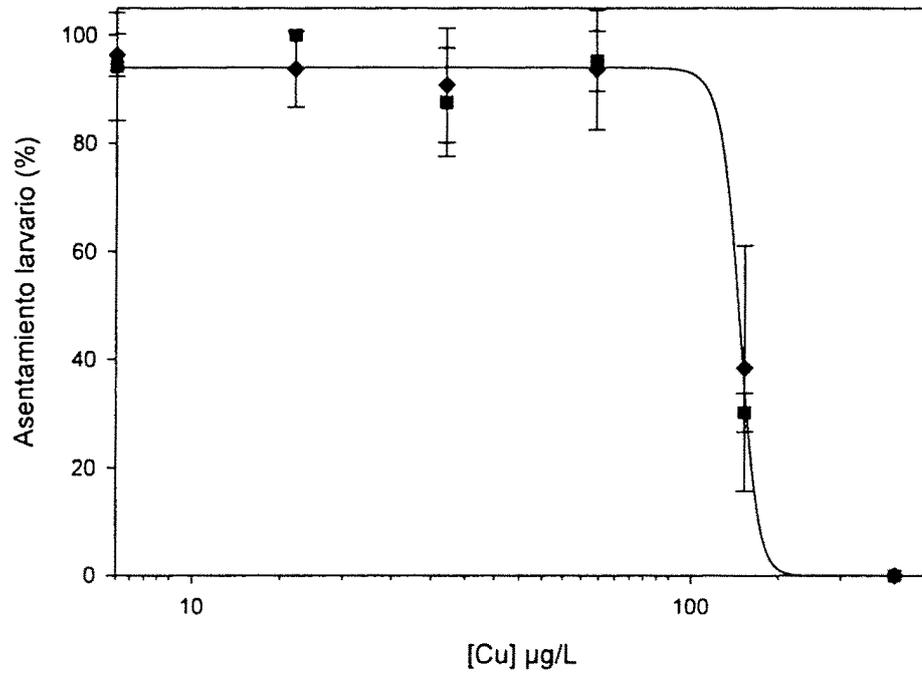


Figura 1



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 333 573

② Nº de solicitud: 200801145

③ Fecha de presentación de la solicitud: **21.04.2008**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A01K 61/00** (2006.01)
A01K 67/033 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑥ Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| X | BELLAS J. Comparative toxicity of alternative antifouling biocides on embryos and larvae of marine invertebrates. Science of the Total Environment, 2006, vol. 367, páginas 573-585. | 1-4 |
| X | BELLAS J. Toxicity assessment of the antifouling compound pyrithione using early developmental stages of the ascidian Ciona intestinalis. Biofouling, 2005, vol. 21(5/6), páginas 289-296. | 1-4 |
| X | BELLAS, J. et al. Toxicity of Hg, Cu, Cd and Cr on early developmental stages of Ciona intestinalis (Chordata, Ascidiacea) with potential application in marine water quality assessment. Water Research, 2001, vol. 35, páginas 2905-2912. | 1-4 |
| A | BELLAS, J. et al. A standarization of Ciona intestinalis (Chordata, Ascidiacea) embryo-larval bioassay for ecotoxicological studies. Water Research, 2003, vol. 37, páginas 4613-4622. | 1-4 |
| A | PENNATI R. et al. Toxic effects of two pesticides, Imazalil and Tradimefon, on the early development of the ascidian Phallusia mammillata (Chordata, Ascidiacea). Aquatic Toxicology, 2006, vol. 79, páginas 205-212. | 1,2 |
| A | CIMA, F. et al. Toxicity of organotin compounds on embryos of a marine invertebrate (Styela plicata; Tunicata). Ecotoxicology and environmental safety, 1996, vol. 35, artículo 97. | 1,2 |

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
10.02.2010

Examinador
A. Polo Díez

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A01K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 10.02.2010

Declaración

| | | |
|--|----------------------|-----------|
| Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones 1-4 | SÍ |
| | Reivindicaciones | NO |
| Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986) | Reivindicaciones | SÍ |
| | Reivindicaciones 1-4 | NO |

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

Consideraciones:

Los documentos de la solicitud de patente sobre los que se basa esta Opinión Escrita son el resultado de las modificaciones efectuadas durante el proceso de examen formal y técnico de la solicitud de patente.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

| Documento | Número Publicación o Identificación | Fecha Publicación |
|-----------|-------------------------------------|-------------------|
| D01 | BELLAS | 2006 |
| D02 | BELLAS | 2005 |
| D03 | BELLAS et al. | 2001 |
| D04 | BELLAS et al. | 2003 |
| D05 | PENNATI et al. | 2006 |
| D06 | CIMA et al. | 1996 |

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención reivindicada (reivindicación independiente) trata de un procedimiento para evaluar un compuesto químico como antifouling que comprende las etapas de:

- a) Transferir un número de larvas de ascidia a un recipiente con una solución que contenga el compuesto a evaluar.
- b) Exponer las larvas a la solución durante 24 h en oscuridad. c) Lavar del recipiente para eliminar la solución y las larvas no asentadas.
- d) Hacer un recuento de las larvas asentadas en el recipiente y determinar el porcentaje de asentamiento.

Las reivindicaciones dependientes 2 a 4 contienen algunos detalles del procedimiento de la reivindicación 1.

Novedad y actividad inventiva (art. 6 y 8 de la L.P.)

Los documentos D1 a D3 divulgan un procedimiento esencialmente igual al que se reivindica en la solicitud. En los tres documentos se utilizan las larvas de la ascidia *Ciona intestinalis* para evaluar la toxicidad de ciertos compuestos químicos y ésta se valora en función del porcentaje de asentamiento de las larvas. Las únicas diferencias de las reivindicaciones de la solicitud y de cada uno de estos documentos es que la exposición de las larvas en los documentos D1 a D3 es de 48 horas y que no especifica que el procedimiento se lleve a cabo en oscuridad ni en placas multipocillo. Sin embargo, estas diferencias se consideran meros detalles de diseño que cualquier experto en la materia podría utilizar, sin que confieran a la invención actividad inventiva con respecto al estado de la técnica ya conocido.

En consecuencia, y teniendo en cuenta los documentos D1 a D3, se considera que las reivindicaciones 1-4 tienen novedad en el sentido del artículo 6 de la Ley de Patentes pero no cumplen el requisito de actividad inventiva (artículo 8 de la Ley de Patentes)

Los demás documentos citados en el informe (D4 a D6) únicamente reflejan el estado de la técnica. Se trata de documentos que también utilizan ascidias para evaluar la toxicidad de determinados compuestos, pero en vez de tomarse como indicador de la misma el porcentaje de asentamiento de las larvas, se utilizan otros parámetros relativos a la fertilización o al desarrollo embrionario como el porcentaje de fertilización o el de larvas malformadas.