

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 117**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/00** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

**G01N 33/66** (2006.01)

**G01N 30/88** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.08.2012 E 12181259 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2015 EP 2568283**

54 Título: **Procedimiento de determinación de una huella química específica de la producción de micotoxinas**

30 Prioridad:

**08.09.2011 FR 1157992**

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

**22.01.2016**

73 Titular/es:

**CENTRE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE DU  
BATIMENT (100.0%)  
84 avenue Jean Jaurès  
77420 Champs sur Marne, FR**

72 Inventor/es:

**MOULARAT, STÉPHANE y  
ROBINE, ENRIC**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 557 117 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

Procedimiento de determinación de una huella química específica de la producción de micotoxinas

### Campo técnico de la invención

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para determinar una huella química específica de la producción de micotoxinas en ambientes interiores.

Por ambiente interior se entiende un espacio confinado en el interior de un edificio que no se airea continuamente. Ejemplos de ambientes interiores se pueden encontrar en las viviendas, museos, iglesias, cuevas, monumentos históricos, edificios administrativos, escuelas y hospitales.

10 La OMS, en su informe "Directrices de la OMS para la calidad del aire interior: humedad y moho" (2009), recuerda la importancia sanitaria en adelante reconocida de los hongos microscópicos que invaden nuestros hábitats, y en particular su capacidad para generar patologías tóxicas asociadas a las micotoxinas que producen. También, la detección preventiva de esas entidades biológicas no deseadas presenta un interés creciente para la protección de los ocupantes.

15 En este contexto, el índice de contaminación fúngica puesto a punto por el solicitante y descrito en la solicitud WO 2008/125770 podría completarse para una detección precoz de micotoxinas.

### Estado de la técnica anterior

Así, Zeringue et al. en 1993 han constatado diferencias de emisiones de COV (compuestos orgánicos volátiles) entre cepas de *Aspergillus flavus* toxígenas (productoras de aflatoxinas) y cepas no toxígenas.

20 En 1993, Desjardins determina que el tricodieno volátil es el primer metabolito en la ruta biosintética de los tricotecenos. Este resultado también se encuentra por Jelen et al. (1995; 1997a; 1997b) que establecen una correlación entre la síntesis de tricotecenos y la producción de tricodieno y de otros sesquiterpenos por *Fusarium sambucinum*, *F. sporotrichoides*, *F. poae* y *F. graminearum*.

Pasanen et al. (1996) indican que la producción de terpenos y sesquiterpenos volátiles por cepas de *Fusarium* está asociada a la producción de tricotecenos.

25 En lo que respecta a la producción de micotoxinas, ésta no es significativamente detectable más que después de una contaminación fúngica avanzada, mientras que se desea evitar la generación de micotoxinas en el aire. Además, una detección de micotoxinas se presenta muy difícil en comparación con una detección de COV.

30 Para paliar estos inconvenientes, se conoce de la solicitud WO 2008/125770 indicada anteriormente un procedimiento de detección de una contaminación fúngica de un ambiente interior con el cálculo de un índice químico de contaminación fúngica. Sin embargo, la realización de este procedimiento no permite específicamente concluir si hay o no producción de micotoxinas.

### Presentación de la invención

En este contexto, es particularmente interesante estudiar la relación entre las emisiones de COV y el carácter toxígeno de una cepa fúngica.

35 La determinación de una huella química específica de la producción de micotoxinas permitiría entonces completar los índices de contaminaciones fúngicas ya desarrollados por el solicitante, proporcionando criterios claros y precisos para las decisiones sobre la ocupación y renovación de edificios contaminados.

Por tanto, el solicitante propone un procedimiento para determinar una producción de micotoxinas en un ambiente interior que comprende las etapas de:

40 (a) toma de una muestra de aire en el ambiente interior, después

(b) detección de COV en la muestra.

Según un primer aspecto la etapa (b) comprende una búsqueda de una huella química que comprende al menos una molécula diana que es un COV, asociado a una micotoxigenesis.

En particular, la molécula diana es un COV cíclico, asociado a una micotoxigenesis.

45 De manera particularmente conveniente, la detección de tales moléculas diana es más fácil y más rápida que la detección de micotoxinas.

Dicha molécula diana se selecciona en el grupo que comprende ilangeno, germacreno D, 1-1-dimetilbutilbenceno, 1,1,2-trimetil-propil-benceno, 1-hexiltetradecil-benceno, tetratetracontano, 1-etildecil-benceno, butilato de hidroxitolueno, 1-butiloctilbenceno, y 1-propilnonilbenceno.

5 Según una variante, la huella química comprende al menos dos moléculas diana de las que al menos una es un sesquiterpeno.

Preferiblemente, la huella química comprende todas las moléculas diana mencionadas.

10 Según una variante interesante, el procedimiento comprende una etapa de búsqueda de zonas de contaminación fúngica; esta búsqueda se realizará antes de la toma de muestras de aire. Por tanto, en el caso en que un crecimiento de hongos es visible a simple vista y forma una zona de contaminación fúngica, se puede realizar la toma de aire en relación con esta zona de contaminación. Una búsqueda de zonas de contaminación fúngica puede comprender también análisis por microscopía, pruebas microbiológicas o bioquímicas.

Según un segundo aspecto, el procedimiento comprende las etapas de:

- 15 (a) toma de una muestra de aire en el ambiente interior; después  
 (b) detección de COV en la muestra, que comprende una detección de la presencia o ausencia de ciertos COV predeterminados, procedentes del metabolismo fúngico, comprendiendo estos COV predeterminados al menos un COV de cada una de las tres categorías de COV siguientes:  
 (1) los COV que se emiten independientemente de la especie fúngica y de su soporte y que no se emiten más que por especies fúngicas;  
 20 (2) los COV que se emiten independientemente de la especie fúngica y del soporte, y que se emiten por especies biológicas no fúngicas;  
 (3) los COV que se emiten en función de la especie fúngica y/o de su soporte;  
 (c) cálculo de un índice químico de contaminación fúngica en función respectivamente de la presencia y de la ausencia de los COV predefinidos procedentes del metabolismo fúngico.

25 Por "soporte" de una especie fúngica se entiende el material sobre el que se desarrolla la especie fúngica, preferiblemente un material de construcción tal como papel pintado, tela de vidrio o similares.

Después, el procedimiento comprende una etapa (d) de búsqueda de una huella química que comprende al menos una molécula diana que es un COV, asociado a una micotoxigenesis.

30 El procedimiento según el segundo aspecto de la invención es particularmente útil para la detección precoz de una producción de micotoxinas, es decir, antes de la aparición de cantidades detectables de micotoxinas. Esta posibilidad de detección precoz es especialmente interesante porque no necesita una detección directa de micotoxinas. Por tanto se puede manifestar la producción de micotoxinas en una etapa precoz de desarrollo de los hongos. Por "etapa precoz" de desarrollo se entiende una etapa en la que los hongos son invisibles en la superficie del soporte, y preferiblemente indetectables por análisis microbiológico del aire, pero sin embargo producen metabolitos y productos de degradación inhalables y responsables en ciertos casos de enfermedades.

### 35 Descripción detallada de un modo de realización

Un estudio de las emisiones de COV procedentes de una cepa de *Aspergillus versicolor* se ha llevado a cabo en diferentes condiciones de crecimiento:

- condiciones de crecimiento que permiten la producción de esterigmatocistina, llamadas condiciones de micotoxigenesis, y  
 40 - condiciones de crecimiento que no permiten la producción de esterigmatocistina, llamadas condiciones de no micotoxigenesis.

Se pusieron en cultivo muestras de *Aspergillus versicolor* sobre una tela de vidrio y sobre papel pintado. El cultivo se realizó en un medio nutriente cuya composición es la siguiente: para 1 litro de disolución tamponada en el pH (pH 7,4):

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> : 1 g	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O: 0,01 g
KCl: 0,5 g	Glucosa: 31,5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O: 0,5 g	NaNO <sub>3</sub> : 3,5·10 <sup>-2</sup> g

45 La disolución tamponada a pH 7,4 se prepara por ejemplo con 250 ml de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M, a los que se añaden 145,5 ml de NaOH 0,1 M; y la disolución se completa hasta 500 ml con agua destilada.

Después de un cultivo en condiciones de micotoxigenesis, se tomaron muestras de aire en los dos casos. No se detectó producción alguna de micotoxina (en particular esterigmatocistina) en las pruebas sobre el soporte de tela de vidrio.

5 En cambio este estudio ha demostrado que sobre el soporte de papel pintado hay no solamente una producción de micotoxinas, sino también una producción de más de una decena de compuestos (incluyendo sesquiterpenos) en relación con los esquemas metabólicos complejos seguidos por la micotoxigenesis. Por tanto estos compuestos se pueden utilizar como moléculas diana. Análisis complementarios del soporte de papel pintado han revelado que estos compuestos no provienen del papel pintado. Esto demuestra que estos compuestos están directamente relacionados con la producción de micotoxinas.

10 En particular, se han identificado las moléculas diana siguientes:

cububeno, cadieno, copaeno, ilangeno, germacreno D, muurolano, 1-1-dimetilbutilbenceno, 1,1,2-trimetil-propil-benceno, 1-hexiltetradecil-benceno, tetratetracontano, 1-etildecil-benceno, butilato de hidroxitolueno, 1-butiloctilbenceno, 1-propilnonilbenceno, 2-metilisoborneol, así como sesquiterpenos.

15 Se pueden identificar otras moléculas diana. Generalmente, moléculas diana de este tipo pueden consistir en cualquier compuesto en relación con los esquemas metabólicos seguidos por la micotoxigenesis, es decir, un compuesto producido por hongos durante la micotoxigenesis. Se infiere de los primeros análisis que una gran proporción de estos compuestos comprende anillos (a veces bencénicos). Además, estos compuestos tienen, en su mayor parte, un peso molecular superior a 204.

20 Por tanto, se puede determinar una huella química específica de la producción de micotoxinas para completar los índices de contaminación fúngica ya desarrollados en la solicitud WO 2008/125770, proporcionando criterios claros y fiables para las decisiones concernientes por ejemplo a la ocupación y renovación de edificios contaminados.

25 En el caso de *Aspergillus versicolor*, una huella química observada está constituida por las moléculas diana siguientes: cububeno, cadieno, copaeno, ilangeno, germacreno D, muurolano, 1-1-dimetilbutilbenceno, 1,1,2-trimetil-propil-benceno, 1-hexiltetradecil-benceno, tetratetracontano, 1-etildecil-benceno, butilato de hidroxitolueno, 1-butiloctilbenceno, 1-propilnonilbenceno, 2-metilisoborneol, así como sesquiterpenos.

Desde un punto de vista práctico, tras la determinación de la presencia de un desarrollo fúngico por el índice de contaminación fúngica, la búsqueda de las dianas específicas de la micotoxigenesis permite alertar sobre una producción probable de micotoxinas asociada a ese desarrollo fúngico. El número de dianas presentes está entonces ligado a un riesgo de exposición a estos metabolitos.

30 En la aplicación del procedimiento según una variante preferida, se realizan sucesivamente las etapas de:

- a) toma de una muestra de aire en un ambiente interior, por ejemplo cerca de las zonas sospechosas de estar contaminadas;
- b) detección de COV en la muestra, que comprende una detección de la presencia o ausencia de ciertos COV predeterminados procedentes del metabolismo fúngico, comprendiendo estos COV predeterminados al menos un COV de cada una de las tres categorías de COV siguientes:

- (1) los COV que se emiten independientemente de la especie fúngica y de su soporte y que no se emiten más que por especies fúngicas;
- (2) los COV que se emiten independientemente de la especie fúngica y del soporte, pero que pueden también tener otros orígenes biológicos
- 35 por COV que tienen "otros orígenes biológicos" se entiende en particular COV emitidos por especies biológicas no fúngicas;
- (3) los COV que se emiten en función de la especie fúngica y/o de su soporte;

40 c) cálculo de un índice químico de contaminación fúngica en función respectivamente de la presencia y de la ausencia de los COV predefinidos, procedentes del metabolismo fúngico, de acuerdo con el procedimiento descrito en la solicitud WO 2008/125770 para determinar si hay una contaminación fúngica;

Después, para determinar si hay una producción de micotoxinas se realizan además las etapas de

- d) búsqueda de al menos una molécula diana, procedente de una micotoxigenesis, cuyo peso molecular es opcionalmente superior a 200 g/mol, en particular al menos una molécula diana seleccionada en el grupo que comprende cububeno, cadieno, copaeno, ilangeno, germacreno D, muurolano, 1-1-dimetilbutilbenceno, 1,1,2-trimetil-propil-benceno, 1-hexiltetradecil-benceno, tetratetracontano, 1-etildecil-benceno, butilato de hidroxitolueno, 1-butiloctilbenceno, 1-propilnonilbenceno, 2-metilisoborneol, al menos un sesquiterpeno;
- 50 e) búsqueda de una huella química que comprende al menos dos de dichas moléculas diana.

De manera interesante, nueva e inventiva, los resultados procedentes de las etapas d) y e) permiten determinar con precisión, claridad y fiabilidad si hay o no una producción de micotoxinas.

5 Este modo de realización conduce por supuesto a resultados más completos que los de la técnica anterior, porque se llega no solamente a concluir que existe una contaminación fúngica sin signo visible de desarrollo fúngico, sino que además se llega a determinar de manera precisa y fiable que hay una producción de micotoxinas.

En otra variante de la invención, también se pueden investigar zonas de contaminación fúngica; después, tomar una muestra de aire en la proximidad de estas zonas de contaminación fúngica antes de investigar dicha o dichas moléculas diana mencionadas anteriormente.

10 Tal búsqueda de zonas de contaminación fúngica se puede efectuar por ejemplo a simple vista, por análisis mediante microscopía o por pruebas microbiológicas o bioquímicas.

La toma de muestra de aire se realiza por ejemplo por muestreo difusivo sobre un adsorbente sólido de tipo carbographe 4. La detección se realiza por ejemplo mediante cromatografía en fase gaseosa seguida por espectrometría de masas (GC/MS). Se pueden utilizar otros métodos de detección.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de determinación de una producción de micotoxinas en un ambiente interior que comprende las etapas de:
  - (a) toma de una muestra de aire en el ambiente interior, después
  - (b) detección de COV en la muestra,
- 5 caracterizado porque la etapa (b) comprende una búsqueda de una huella química que comprende al menos una molécula que es un COV, asociado a una micotoxigenesis, seleccionada en el grupo que comprende ilangeno, germacreno D, 1-1-dimetilbutilbenceno, 1,1,2-trimetil-propil-benceno, 1-hexiltetradecil-benceno, tetratetracontano, 1-etildecil-benceno, butilato de hidroxitolueno, 1-butiloctilbenceno y 1-propilnonilbenceno.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que dicha huella química comprende al menos dos moléculas diana seleccionadas en el grupo que comprende cububeno, cadieno, copaeno, ilangeno, germacreno D, muurolano, 1-1-dimetilbutilbenceno, 1,1,2-trimetil-propil-benceno, 1-hexiltetradecil-benceno, tetratetracontano, 1-etildecil-benceno, butilato de hidroxitolueno, 1-butiloctilbenceno, 1-propilnonilbenceno, 2-metilisoborneol, al menos un sesquiterpeno, y de las que al menos una molécula diana es un sesquiterpeno.
- 15 3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado por que dicha huella química comprende todas las moléculas diana mencionadas.
4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende una etapa de búsqueda de zonas de contaminación fúngica realizada antes de la etapa (a).
5. Procedimiento de determinación de una producción de micotoxinas en un ambiente interior según la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
  - (a) toma de una muestra de aire en el ambiente interior; después
  - (b) detección de COV en la muestra, que comprende una detección de la presencia o ausencia de ciertos COV predeterminados procedentes del metabolismo fúngico, comprendiendo estos COV predeterminados al menos un COV de cada una de las tres categorías de COV siguientes:
    - 20 (1) los COV que se emiten independientemente de la especie fúngica y de su soporte y que no se emiten más que por especies fúngicas;
    - (2) los COV que se emiten independientemente de la especie fúngica y del soporte, y que se emiten por especies biológicas no fúngicas;
    - (3) los COV que se emiten en función de la especie fúngica y/o de su soporte;
  - (c) cálculo de un índice químico de contaminación fúngica en función respectivamente de la presencia y de la ausencia de los COV predefinidos, procedentes del metabolismo fúngico,
- 25 caracterizado por que el procedimiento comprende después una etapa (d) de búsqueda de una huella química que comprende al menos una molécula diana que es un COV, asociado a una micotoxigenesis.
- 30 6. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por que dicha molécula diana se selecciona en el grupo que comprende cububeno, cadieno, copaeno, ilangeno, germacreno D, muurolano, 1-1-dimetilbutilbenceno, 1,1,2-trimetil-propil-benceno, 1-hexiltetradecil-benceno, tetratetracontano, 1-etildecil-benceno, butilato de hidroxitolueno, 1-butiloctilbenceno, 1-propilnonilbenceno, 2-metilisoborneol, al menos un sesquiterpeno.
- 35 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 5 ó 6, caracterizado por que la huella química comprende al menos dos moléculas diana de las que al menos una es un sesquiterpeno.
- 40 8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 5 a 7, caracterizado por que la huella química comprende todas las moléculas diana mencionadas.