

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 215**

21 Número de solicitud: 201631464

51 Int. Cl.:

G01N 33/02 (2006.01)

A23L 5/20 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

16.11.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

17.05.2018

71 Solicitantes:

BIOVET, S.A. (100.0%)
C. Luxemburgo, 25, Pol. Ind. Constantí
43120 CONSTANTÍ (Tarragona) ES

72 Inventor/es:

BORRELL VALLS, Jaime

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE MICOTOXINAS EN ANIMALES MONOGÁSTRICOS Y POLIGÁSTRICOS**

57 Resumen:

Procedimiento de evaluación de la capacidad de adsorción de micotoxinas en animales monogástricos y poligástricos.

La presente invención se refiere a un procedimiento de evaluación de la capacidad de adsorción de micotoxinas en animales monogástricos y poligástricos, que comprende las etapas de: (a) disponer una muestra con micotoxinas sobre membranas compuestas de geles de dextrano y polietileno; (b) añadir pepsina a la muestra; (c) añadir el captador de micotoxinas a analizar en una parte de la muestra; (d) someter esta parte de la muestra con captador de micotoxinas sucesivamente a diferentes condiciones de pH y cuantificar la concentración de micotoxinas adsorbidas por el captador de micotoxinas después de cada condición de pH; (e) repetir la etapa (d) con la otra parte de la muestra sin el captador de micotoxinas; (f) comparar los resultados de adsorción obtenidos con la parte de la muestra que contiene captador de micotoxinas y la parte de la muestra que no contiene el captador de micotoxinas.

ES 2 668 215 A1

DESCRIPCIÓN

PROCEDIMIENTO DE EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE ADSORCIÓN DE MICOTOXINAS EN ANIMALES MONOGÁSTRICOS Y POLIGÁSTRICOS

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la analítica de micotoxinas. En particular, la presente invención se refiere a un procedimiento de evaluación de la capacidad de adsorción de micotoxinas en animales monogástricos y poligástricos en el que se pretenden simular las condiciones en el tracto digestivo con la finalidad de determinar de forma precisa dicha capacidad de adsorción.

10

Antecedentes de la invención

15

Las micotoxinas son metabolitos fúngicos que afectan a todas las cosechas y por tanto a la producción ganadera, ya que los cereales utilizados en la fabricación de piensos están contaminados por las mismas.

20

En la industria existen diversos sistemas utilizados para el control o eliminación de micotoxinas con el fin de que éstas no sean absorbidas por los animales y por tanto se minimicen los efectos patógenos de las mismas y su incidencia en los parámetros productivos. Para poder aconsejar o decidir cuándo usar un sistema u otro para el control de las micotoxinas, deben realizarse una serie de análisis sobre la capacidad que cada uno de estos sistemas tiene para absorber las micotoxinas.

25

En el año 1977 se iniciaron los estudios de campo sobre el control de fijación o adsorción de micotoxinas por el Dr. Hernández (resultados finalmente no publicados), en los que se realiza una aproximación a la estructura digestiva de los animales monogástricos, estudiando una muestra contaminada con aflatoxina en un sistema parecido a un estómago a pH = 3.

30

Posteriormente, en "Newer methods which simulate the G.I.T. (and estimate absorption)" (Doll et al., 2004, Doll and Danicke, 2004 and Avantaggiato et al., 2004) se amplía el estudio considerando también la adsorción a nivel intestinal, realizando un estudio más amplio a pH = 3 y pH =6, correspondiente al pH del duodeno. Esta técnica, aunque más exacta, no tiene en cuenta el último tramo del intestino, es decir el colon.

35

Este último tramo afecta a la fijación de las micotoxinas, de modo que se produce una desorción de las micotoxinas y éstas tienen entrada al torrente sanguíneo a través del sistema venoso de las hemorroides superiores, que son una ramificación de la vena porta, mediante lo cual algunas micotoxinas pasan directamente al sistema porta-hepático y otras micotoxinas pasarían a la corriente sanguínea a través del sistema de las hemorroides medias e inferiores, que son una ramificación de la vena cava, transportando las micotoxinas adsorbidas a la circulación general sistémica.

10 Por lo tanto, existe la necesidad de un procedimiento más preciso que permita la evaluación de la capacidad de adsorción de micotoxinas tanto en animales monogástricos como poligástricos con el fin de evitar su presencia.

15 La presente invención pretende dar a conocer un procedimiento mediante el cual se consigue cubrir esta necesidad.

Descripción resumida de la invención

20 La presente invención se refiere a un procedimiento de evaluación de la capacidad de adsorción de micotoxinas en animales monogástricos y poligástricos.

Descripción de la invención

25 La presente invención se refiere a un procedimiento de evaluación de la capacidad de adsorción de micotoxinas en animales monogástricos y poligástricos, que comprende las etapas de:

- (a) disponer una muestra con micotoxinas sobre membranas compuestas de geles de dextrano y polietileno;
- (b) añadir pepsina a la muestra;
- 30 (c) añadir el captador de micotoxinas a analizar en una parte de la muestra;
- (d) someter esta parte de la muestra con captador de micotoxinas sucesivamente a diferentes condiciones de pH y cuantificar la concentración de micotoxinas adsorbidas por el captador de micotoxinas después de cada condición de pH;
- (e) repetir la etapa (d) con la otra parte de la muestra sin el captador de micotoxinas;
- 35 (f) comparar los resultados de adsorción obtenidos con la parte de la muestra que contiene el captador de micotoxinas y la parte de la muestra que no contiene el captador de micotoxinas.

A modo de ejemplo, dicho captador de micotoxinas es glucomananos, enzimas, clinoptilolita, silicoglicidol o una combinación de los mismos.

- 5 Este procedimiento pretende imitar el recorrido del bolo alimentario a través del sistema digestivo de los animales, tanto en lo referente al sistema de adsorción a nivel del epitelio de los enterocitos de los distintos tramos intestinales que se simularán a través de un sistema de filtración, como de los distintos valores de pH que se pueden hallar en el sistema digestivo.
- 10 El epitelio intestinal que recubre el interior del colon y el recto está formado por diversas capas que permiten la permeabilidad de moléculas de diversos pesos moleculares.

Tal como se muestra en la etapa (a) del procedimiento, el filtro que imitaría este tramo del epitelio está formado por membranas compuestas por diversos geles de dextrano (Purath, J. y Flodin, P. Nature 183, 1657; 1959) y de polietileno (Moore, J; J. Polym. Sci, 2, 835; 1964) que adsorben aminoácidos, ácidos grasos y carbohidratos hidrolizados durante la digestión.

15

En la primera sección del epitelio intestinal se adsorben las sustancias de peso molecular (en g/mol) de 83 a 291, por ejemplo los aminoácidos (lisina 146,19, metionina 149,21, leucina 131,17), los ácidos grasos (ácido butírico 88,11, ácido esteárico 284,48, ácido oleico 288,3) y los azúcares (glucosa 180,1; fructosa 180,16). Todos ellos proceden de la digestión de los principios nutricionales de los alimentos. Los números anteriores se refieren todos al peso molecular del compuesto mencionado.

20

En la segunda sección del epitelio intestinal se adsorben las sustancias de peso molecular de 291 a 833, por ejemplo las micotoxinas libres no fijadas por el captador (deoxinivalenol 296, zearalenona 318, aflatoxinas 312-330, excepto la aflatoxina G2 que tiene un peso molecular de 346, ocratoxina 403 y fumonisina 721) y enzimas, tales como la sacarasa 342,29. Los números anteriores se refieren todos al peso molecular del compuesto mencionado.

25

En la tercera sección del epitelio intestinal se adsorben moléculas complejas de peso molecular de 833 a 12.500 resistentes a los jugos digestivos, tales como subunidades de enzimas digestivos (peptidasas) y componentes simples de almidones (amilosa).

30

En una realización preferida de la invención, dichos animales son monogástricos. Por "monogástricos" se entienden aquellos animales que presentan un estómago simple, con una

35

capacidad de almacenamiento media como la del ser humano. Los animales monogástricos no hacen fermentación pregástrica, sin embargo, algunos, tales como los conejos y caballos, hacen una fermentación postgástrica, gracias a que poseen un ciego funcional, el cual en su interior posee microorganismos capaces de digerir eficientemente porciones de fibra (celulosa y hemicelulosa). Entre los ejemplos de animales monogástricos se incluyen omnívoros, tales como humanos, ratas y cerdos; carnívoros, tales como perros y gatos; y herbívoros, tales como caballos y conejos.

En una realización más preferida, en el caso de animales monogástricos, las condiciones de pH en la etapa d) es de pH 3, posteriormente pH 5 y finalmente pH 9.

En otra realización preferida de la invención, dichos animales son poligástricos. Por “poligástricos” se entienden animales, también denominados rumiantes, en los que la estructura anatómica de sus estómagos es compleja por estar formada por 4 compartimentos. Los cuatro compartimentos son: el retículo, rumen, omaso y abomaso. Los tres primeros se denominan conjuntamente preestómagos y poseen una mucosa aglandular (epitelio sin capacidad de producir jugos con función digestiva).

En una realización más preferida, en el caso de animales poligástricos, las condiciones de pH en la etapa d) es de pH 6,1, posteriormente pH 2,5, posteriormente pH 7,5, posteriormente pH 4,2 y finalmente pH 7.

Preferiblemente, la cuantificación de la concentración de micotoxinas que se realiza en la etapa de comparación f) se realiza mediante ELISA.

En una realización de ejemplo más preferida de la etapa (d) en el caso de animales monogástricos:

(d1) La adsorción a pH 3 se realiza con una solución acuosa tóxica, un tampón de pH 3 de, por ejemplo, fosfato disódico ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$) 1M y ácido fosfórico (H_3PO_4) 0,1 M (que simula el pH estomacal) y un captador de micotoxinas de concentración 0,05% p/p. Se agitan durante 2 horas a 38°C o 42°C. A continuación se realiza una centrifugación (10 min, 4.500 r.p.m.) a 15 ml de alícuota de la muestra.

(d2) A continuación, se cambia el pH de la muestra a pH 5 mediante una base adecuada, tal como bicarbonato sódico. Se agita la muestra durante 2 horas a 38°C y a continuación se realiza una centrifugación (10 min, 4.500 r.p.m.) a 15 ml de alícuota de la muestra.

(d3) A continuación, se cambia el pH de la muestra a pH 9 mediante una base adecuada, tal como bicarbonato sódico. Se agita la muestra durante 2 horas a 38°C y a continuación se realiza una centrifugación (10 min, 4.500 r.p.m.) a 15 ml de alícuota de la muestra.

5 En una realización de ejemplo más preferida de la etapa d) en el caso de animales poligástricos:

(d1) La adsorción a pH 6,1 se realiza con una solución acuosa tóxica, un tampón de pH 6,1 de, por ejemplo, Na_2HPO_4 (fosfato sódico dibásico): NaHPO_4 (fosfato sódico monobásico) en
10 proporción en volumen 15:85, y un captador de micotoxinas de concentración 0,05% p/p. Se agitan durante 2 horas a 42°C. A continuación se realiza una centrifugación (10 min, 4.500 r.p.m.) a 15 ml de alícuota de la muestra.

(d2) A continuación, se cambia el pH de la muestra a pH 2,5 mediante un ácido adecuado, por ejemplo HCl. Se agita la muestra durante 2 horas a 38°C y a continuación se realiza una
15 centrifugación (10 min, 4.500 r.p.m.) a 15 ml de alícuota de la muestra.

(d3) A continuación, se cambia el pH de la muestra a pH 7,5 mediante una base adecuada, tal como bicarbonato sódico. Se agita la muestra durante 2 horas a 38°C y a continuación se realiza una centrifugación (10 min, 4.500 r.p.m.) a 15 ml de alícuota de la muestra.

(d4) A continuación, se cambia el pH de la muestra a pH 4,2 mediante un ácido adecuado, por ejemplo HCl. Se agita la muestra durante 2 horas a 38°C y a continuación se realiza una
20 centrifugación (10 min, 4.500 r.p.m.) a 15 ml de alícuota de la muestra.

(d5) A continuación, se cambia el pH de la muestra a pH 7 mediante una base adecuada, tal como bicarbonato sódico. Se agita la muestra durante 2 horas a 38°C y a continuación se realiza una centrifugación (10 min, 4.500 r.p.m.) a 15 ml de alícuota de la muestra.

25

A continuación, se ilustrará la invención mediante ejemplos que no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

EJEMPLOS

30

1. Simulación de un procedimiento de un estudio de adsorción de micotoxinas de captadores para uso en animales monogástricos.

Se prepara una solución de agua destilada con la cantidad de micotoxinas que se considere
35 oportuna (a modo de ejemplo se pueden utilizar 300 ppb de aflatoxinas, 1 ppm de zearalenona

o fumonisina B1 en solución alcohólica). Se añade pepsina a esta solución que contiene las micotoxinas a razón de 17.331 unidades internacionales (UI) por litro.

5 Se divide la muestra en dos partes, una que se analizará tal cual (actúa de blanco) y otra a la que se añaden 0,5 g/litro del captador de micotoxinas.

Dado que en el tracto intestinal de los monogástricos el bolo alimentario pasara por un pH de 3, después de 5 y finalmente de 9, procedemos a reproducir estas condiciones ajustando el pH.

10

(1). En primer lugar se utiliza HCl (ácido clorhídrico) para bajar el pH a 3. Se agita a 38-42°C durante 2 horas. Se toma una muestra 15 ml del blanco y otra de la solución problema y se centrifugan 10 minutos a 4.500 rpm. Se recoge el sobrenadante que contiene la cantidad de micotoxinas libres (por lo tanto las no adsorbidas por el captador de micotoxinas) y se
15 cuantifica mediante ELISA.

El resultado de la adsorción se calcula como: concentración de micotoxinas libre del control – concentración de micotoxinas libre de la muestra con captador.

20

(2). Se toman las muestras y se llevan a pH 5 mediante el uso de NaHCO₃ 0,5 M (carbonato monosódico). Se toman una muestra de 15 ml del blanco y otra de la solución problema y se centrifugan 10 minutos a 4.500 rpm. Se recoge el sobrenadante que contiene la cantidad de micotoxinas libres (por lo tanto las no adsorbidas por el captador de micotoxinas) y cuantifica mediante ELISA. El resultado de la adsorción se calcula como en la etapa (1).

25

(3). Se toman las muestras y se llevan a pH 9 mediante el uso de NaHCO₃ 0,5 M (carbonato monosódico). Se toman una muestra de 15 ml del blanco y otra de la solución problema y se centrifugan 10 minutos a 4.500 rpm. Se recoge el sobrenadante que contiene la cantidad de micotoxinas libres (por lo tanto las no adsorbidas por el captador de micotoxinas) y cuantifica mediante ELISA. El resultado de la adsorción se calcula como en la etapa (1).

30

Los resultados obtenidos en un test de adsorción de micotoxinas para una concentración inicial de Fumonisina 2 ppm y dosis de captador de micotoxinas 0,5 g/kg, son:

	Adsorción (µg/l)	% adsorción	Desorción (µg/l)	% desorción
pH 3 (estómago)	1999,2	99,96	0,8	0,04

pH 5 (duodeno)	1801,28	90,10	197,92	9,86
pH 9 (recto)	1668,89	83,43	132,39	6,62

% adsorción de todo el sistema digestivo: 83,48 %

2. Simulación de un procedimiento de un estudio de adsorción de micotoxinas de captadores para uso en animales poligástricos.

5

Se prepara una solución de agua destilada con la cantidad de micotoxinas que se considere oportuna (a modo de ejemplo se pueden utilizar 300 ppb de aflatoxinas, 1 ppm de zearalenona o fumonisina B1 en solución alcohólica). Se añade pepsina a esta solución que contiene las micotoxinas a razón de 17.331 unidades internacionales (UI) por litro.

10

Se divide la muestra en dos partes, una que se analizará tal cual (actúa de blanco) y otra a la que se añaden 0,5 g/litro del captador de micotoxinas.

15

Dado que en el tracto intestinal de los poligástricos el bolo alimentario pasara por un pH de 6,1, después de 2,5, posteriormente 7,5, para volver a bajar a 4,2 y finalmente 7, se reproducirán estas condiciones ajustando el pH.

20

(1) En primer lugar, se utiliza NaHCO_3 0.5 M para tamponar el pH a 6,1. Se agita a 38-42°C durante 2 horas. Se toma una muestra 15 ml del blanco y otra de la solución problema y se centrifugan 10 minutos a 4.500 rpm. Se recoge el sobrenadante que contiene la cantidad de micotoxinas libres (por lo tanto las no adsorbidas por el captador de micotoxinas) y se cuantifica mediante ELISA.

25

El resultado de la adsorción se calcula como: concentración de micotoxinas libre del control – concentración de micotoxinas libre de la muestra con captador.

30

(2). Se toman las muestras y se llevan a pH 2,5 mediante el uso de HCl (ácido clorhídrico). Se toman una muestra de 15 ml del blanco y otra de la solución problema y se centrifugan 10 minutos a 4.500 rpm. Se recoge el sobrenadante que contiene la cantidad de micotoxinas libres (por lo tanto las no adsorbidas por el captador de micotoxinas) y cuantifica mediante ELISA. El resultado de la adsorción se calcula como en la etapa (1).

(3) Se toman las muestras y se llevan a pH 7,5 mediante el uso de NaHCO₃ 0.5 M. Se toman una muestra de 15 ml del blanco y otra de la solución problema y se centrifugan 10 minutos a 4.500 rpm. Se recoge el sobrenadante que contiene la cantidad de micotoxinas libres (por lo tanto las no adsorbidas por el captador de micotoxinas) y cuantifica mediante ELISA. El resultado de la adsorción se calcula como en la etapa (1).

(4). Se toman las muestras y se llevan a pH 4,2 mediante el uso de HCl (ácido clorhídrico). Se toman una muestra de 15 ml del blanco y otra de la solución problema y se centrifugan 10 minutos a 4.500 rpm. Se recoge el sobrenadante que contiene la cantidad de micotoxinas libres (por lo tanto las no adsorbidas por el captador de micotoxinas) y cuantifica mediante ELISA. El resultado de la adsorción se calcula como en la etapa (1).

(5) Se toman las muestras y se llevan a pH 7 mediante el uso de NaHCO₃ 0.5 M. Se toman una muestra de 15 ml del blanco y otra de la solución problema y se centrifugan 10 minutos a 4.500 rpm. Se recoge el sobrenadante que contiene la cantidad de micotoxinas libres (por lo tanto las no adsorbidas por el captador de micotoxinas) y cuantifica mediante ELISA. El resultado de la adsorción se calcula como en la etapa (1).

Los resultados comparativos obtenidos en un test de adsorción de micotoxinas para concentración inicial de Aflatoxina B1 300ppb y diversas sustancias captadoras de micotoxinas a dosis todas de 0,5 g/ kg, son:

Captadores de micotoxinas	pH 6 ,1	pH 2,5	pH 7,5	pH 4,2	pH 7
Glucomananos	21,66 %	20,23 %	13,73 %	17,73 %	42,12 %
Enzimas	99,91 %	100 %	99,06 %	100 %	100 %
Clinoptilolita	25,81 %	67 %	61 %	63,70 %	60,4 %
Silicoglicidol	95,67 %	100 %	100 %	63,70 %	100 %

De acuerdo con la tabla, se observa que con el procedimiento de la presente invención se ha dilucidado que tanto las enzimas, como el silicoglicidol, presentan una capacidad de captación de micotoxinas parecido, mientras que la de los glucomananos y la clinoptilolita es mucho menor.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de evaluación de la capacidad de adsorción de micotoxinas en animales monogástricos y poligástricos, que comprende las etapas de:
- 5 (a) disponer una muestra con micotoxinas sobre membranas compuestas de geles de dextrano y polietileno;
- (b) añadir pepsina a la muestra;
- (c) añadir el captador de micotoxinas a analizar en una parte de la muestra;
- (d) someter esta parte de la muestra con captador de micotoxinas sucesivamente a diferentes
- 10 condiciones de pH y cuantificar la concentración de micotoxinas adsorbidas por el captador de micotoxinas después de cada condición de pH;
- (e) repetir la etapa (d) con la otra parte de la muestra sin el captador de micotoxinas;
- (f) comparar los resultados de adsorción obtenidos con la parte de la muestra que contiene captador de micotoxinas y la parte de la muestra que no contiene el captador de micotoxinas.
- 15
- 2.- Procedimiento de evaluación, según la reivindicación 1, en el que dichos animales son monogástricos.
- 3.- Procedimiento de evaluación, según la reivindicación 1 ó 2, en el que las condiciones de
- 20 pH en la etapa d) para animales monogástricos es de pH 3, posteriormente pH 5 y finalmente pH 9.
- 4.- Procedimiento de evaluación, según la reivindicación 1, en el que dichos animales son poligástricos.
- 25
- 5.- Procedimiento de evaluación, según la reivindicación 1 ó 4, en el que las condiciones de pH en la etapa d) para animales poligástricos es de pH 6,1, posteriormente pH 2,5, posteriormente pH 7,5, posteriormente pH 4,2 y finalmente pH 7.
- 30
- 6.- Procedimiento de evaluación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cuantificación de la concentración de micotoxinas se realiza mediante ELISA.
- 7.- Procedimiento de evaluación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la comparación en la etapa f) se realiza mediante la resta entre la concentración de
- 35 micotoxinas de control y la concentración de micotoxinas libre de la muestra con captador.

8.- Procedimiento de evaluación, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el captador de micotoxinas añadido en la etapa (c) es glucomananos, enzimas, clinoptilolita, silicoglicidol o una combinación de los mismos.

5



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201631464

②② Fecha de presentación de la solicitud: 16.11.2016

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/02** (2006.01)
A23L5/20 (2016.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	KONG CHANGSU <i>et al.</i> Evaluation of mycotoxin sequestering agents for aflatoxin and deoxynivalenol: an <i>in vitro</i> approach. SpringerPlus JUL 8 2014. 30/06/2014, Vol. 3, Páginas Article No.: 346, ISSN 2193-1801 (print) ISSN 2193-1801 (electronic), <DOI: doi:10.1186/2193-1801-3-346>. página 1, columna derecha, segundo párrafo; página 2, columna izquierda, segundo párrafo.	1-8
A	M.MANAFI <i>et al.</i> <i>In vitro</i> binding ability of mycotoxin binder in commercial broiler feed. African Journal of Agricultural Research, febrero 2009, Vol. 4, Nº 2, Páginas 141-143, 1991-637X. página 141, columna derecha, primer y segundo párrafo; página 142, columna izquierda, tercer párrafo.	1-8
A	TOMASEVIC-CANOVIC M <i>et al.</i> Surfactant modified zeolites--new efficient adsorbents for mycotoxins. Microporous and Mesoporous Materials, 18/07/2003, Vol. 61, Nº 1-3, Páginas 173 - 180, ISSN 1387-1811, <DOI: doi:10.1016/S1387-1811(03)00365-2>. página 174, columna izquierda, segundo párrafo; página 179, columna derecha.	1-8

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
22.12.2017

Examinador
S. González Peñalba

Página
1/6



21 N.º solicitud: 201631464

22 Fecha de presentación de la solicitud: 16.11.2016

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: **G01N33/02** (2006.01)
A23L5/20 (2016.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	DAKOVIC <i>et al.</i> Adsorption of zearalenone by organomodified natural zeolitic tuff. Journal of Colloid and Interface Science, 20070427 Academic Press, Inc, US. Amendola Vincenzo; Barcikowski Stephan, 27/04/2007, Vol. 311, N° 1, Páginas 8 - 13, ISSN 0021-9797, <DOI: doi:10.1016/j.jcis.2007.02.033>. página 8, columna derecho; página 9, columna izquierda, segundo párrafo; página 9, columna derecha, segundo párrafo.	1-8
A	BORTOLUZZI C <i>et al.</i> Efficacy of yeast derived glucomannan or algae-based antioxidant or both as feed additives to ameliorate mycotoxicosis in heat stressed and unstressed broiler chickens. Livestock science, 20160915 elsevier, amsterdam, NL. Lindberg Jan Erik; Vervuert Ingrid; Coenen Manfred; Saastamoinen Markku, 15/09/2016, Vol. 193, Páginas 20 - 25, ISSN 1871-1413, <DOI: doi:10.1016/j.livsci.2016.09.005>. página 20, columna izquierda.	1-8

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
22.12.2017

Examinador
S. González Peñalba

Página
2/6

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

G01N, A23L

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, NPL, MEDLINE, INTERNET

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 22.12.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-8	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-8	SI
	Reivindicaciones	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 se publica.

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	KONG CHANGSU <i>et al.</i> Evaluation of mycotoxin sequestering agents for aflatoxin and deoxynivalenol: an <i>in vitro</i> approach. SpringerPlus JUL 8 2014. Vol. 3, Páginas Article No.: 346, ISSN 2193-1801(print) ISSN 2193-1801(electronic), <DOI: doi:10.1186/2193-1801-3-346>	30.06.2014
D02	M.MANAFI <i>et al.</i> <i>In vitro</i> binding ability of mycotoxin binder in commercial broiler feed. African Journal of Agricultural Research, Vol. 4, Nº 2, Páginas 141-143, ISSN 1991-637X	febrero 2009
D03	TOMASEVIC-CANOVIC M <i>et al.</i> Surfactant modified zeolites--new efficient adsorbents for mycotoxins. Microporous and Mesoporous Materials, Vol. 61, Nº 1-3, Páginas 173 - 180, ISSN 1387-1811, <DOI: doi:10.1016/S1387-1811(03)00365-2>	18.07.2003
D04	DAKOVIC <i>et al.</i> Adsorption of zearalenone by organomodified natural zeolitic tuff. Journal of Colloid and Interface Science, 20070427 Academic Press, Inc, US. Amendola Vincenzo; Barcikowski Stephan, Vol. 311, Nº 1, Páginas 8 - 13, ISSN 0021-9797, <DOI: doi:10.1016/j.jcis.2007.02.033>	27.04.2007
D05	BORTOLUZZI C <i>et al.</i> Efficacy of yeast derived glucomannan or algae-based antioxidant or both as feed additives to ameliorate mycotoxicosis in heat stressed and unstressed broiler chickens. livestock science, 20160915 elsevier, amsterdam, NL. Lindberg Jan Erik; Vervuert Ingrid; Coenen Manfred; Saastamoinen Markku, Vol. 193, Páginas 20 - 25, ISSN 1871-1413, <DOI: doi:10.1016/j.livsci.2016.09.005>	15.09.2016

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**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA ARTS. 6 Y 8 DE LA LP**

La presente solicitud de patente, a la vista de los documentos citados del estado de la técnica y tal y como ha sido definida en sus reivindicaciones, parece tener novedad y actividad inventiva por no estar incluida en el estado de la técnica analizado ni poder deducirse de éste de un modo evidente por un experto en la materia.

Se han encontrado en el estado de la técnica procedimientos de evaluación de compuestos con capacidad de adsorción de micotoxinas en animales monogástricos y poligástricos, imitando las condiciones de pH del tracto gastrointestinal de ciertos animales. Así, el documento D01 considerado el antecedente tecnológico más próximo hace referencia a un estudio sobre la eficacia de unión de varios agentes captadores de micotoxinas mediante un método *in vitro* que imita las condiciones gastrointestinales de los cerdos (véase página 1, columna derecha, segundo párrafo), en el que el procedimiento se lleva a cabo a pH de 2 y 6,8 simulando las condiciones digestivas (véase página 2, columna izquierda, segundo párrafo) y la cuantificación se realiza mediante el método ELISA. Este documento, sin embargo, no dispone las muestras de micotoxinas sobre membranas compuestas de geles de dextrano y polietileno, ni añade pepsina a las muestras, por lo que no presenta las mismas características técnicas de la reivindicación 1.

Otros documentos como D02 se refieren, también, al estudio *in vitro* de la capacidad de unión de captadores de micotoxinas (véase página 141, columna derecha, primer párrafo). Se evalúa la capacidad de unión mediante un método *in vitro* que simula las condiciones gastrointestinales de pollos (véase página 141, columna derecha, segundo párrafo). El procedimiento se lleva a cabo a pH 4,5 y 6,5 (véase página 142, columna izquierda, tercer párrafo).

Por otro lado, documentos como D03 y D04 describen la capacidad de adsorción de micotoxinas que posee el compuesto clinoptilolita. Así, D03 describe la adsorción de micotoxinas en el tracto gastrointestinal por minerales tales como clinoptilolita (véase página 174, columna izquierda, segundo párrafo y página 179, columna derecha) y el documento D04 divulga el empleo de clinoptilolita en el ámbito agrícola, particularmente en la nutrición animal como adsorbente de micotoxinas. Indica que para evitar la toxicidad de las micotoxinas se añaden a los alimentos de los animales minerales inertes adsorbentes para disminuir, de este modo, la biodisponibilidad de dichas micotoxinas en el tracto gastrointestinal (véase página 8, columna derecha). Sin embargo, algunas micotoxinas, como por ejemplo, zearalenona no se unen de manera efectiva a clinoptilolita por lo que se llevan a cabo ciertas modificaciones con diferentes números de iones (véase página 9, columna izquierda, segundo párrafo). La adsorción se investiga a pH 3, 7 y 9 (véase página 9, columna derecha, segundo párrafo).

Y por último, el documento D05 trata sobre el compuesto glucomanano esterificado, procedente de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* indicando que es un adsorbente utilizado como compuesto de unión a micotoxinas (véase página 20, columna izquierda).

Por lo tanto, se conocen en el estado de la técnica procedimientos de evaluación de la capacidad de adsorción de micotoxinas por compuestos captadores, que se realizan *in vitro*, imitando las condiciones gastrointestinales de los animales, llevando a cabo los estudios a pH diferentes. Y entre los captadores de micotoxinas que se divulgan se encuentran glucomananos y clinoptilolitas, entre otros. Pero no se han encontrado en el estado de la técnica analizado las características técnicas reivindicadas del procedimiento de la presente solicitud de patente, por lo que la reivindicación 1 parece ser nueva e inventiva.

Las restantes reivindicaciones 2-8 dependen directa o indirectamente de la primera y han de interpretarse como añadidas a ésta, por lo que parecen tener, también, novedad y actividad inventiva.

Por consiguiente, las reivindicaciones 1-8 parecen cumplir los requisitos de novedad y actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la LP.