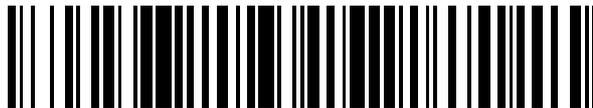


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 158**

21 Número de solicitud: 201730996

51 Int. Cl.:

A61K 31/7024 (2006.01)

A61P 31/10 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

31.07.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

31.01.2019

71 Solicitantes:

**SAGAVET SOLUCIONES, S.L. (100.0%)
C/ Balanço i Boter, 22 ático (planta 2ª)
08302 Mataró (Barcelona) ES**

72 Inventor/es:

CEBRIAN TAPIA, Gregorio

74 Agente/Representante:

ESPIELL VOLART, Eduardo María

54 Título: **ÁCIDO TÁNICO Y JARABE CON ÁCIDO TÁNICO PARA EL TRATAMIENTO DE LAS NOSEMOSIS EN ABEJAS**

57 Resumen:

Uso del ácido tánico así como un jarabe que comprende ácido tánico para el tratamiento de las nosemosis en general y de la tipo C, debida a *Nosema ceranae*, en particular en abejas.

El jarabe comprende entre 0,5 g/l y 12,5 g/l de ácido tánico y una mezcla de azúcar y agua. Preferiblemente entre 2 y 4 g/l de ácido tánico, y más preferiblemente 3,5 g/l.

ES 2 698 158 A1

DESCRIPCIÓN

ÁCIDO TÁNICO Y JARABE CON ÁCIDO TÁNICO PARA EL TRATAMIENTO DE LAS NOSEMOSIS EN ABEJAS

5

OBJETO DE LA INVENCION

La invención, tal como expresa el enunciado de la presente memoria descriptiva, se refiere al uso del ácido tánico para el tratamiento y control de las nosemosis en general y de la tipo C, debida a *Nosema ceranae*, en particular en abejas melíferas así como un jarabe que contiene ácido tánico que presenta características de novedad, que se describirán en detalle más adelante, que suponen una alternativa en el estado actual de la técnica.

15 **CAMPO DE APLICACIÓN DE LA INVENCION**

El campo de aplicación de la presente invención se enmarca dentro del sector de la industria dedicada al cuidado y producción de abejas melíferas e insectos similares (principalmente abejorros), incluyendo tanto la producción de miel y ceras como su utilización como polinizadoras.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La nosemosis tipo C producida por el microsporidio *Nosema ceranae* es una

enfermedad emergente en el siglo XXI que está provocada por el ataque al intestino de las abejas de microorganismos del género *Nosema*, clasificados como hongo, en concreto *Nosema ceranae*. También está descrita la nosemosis tipo A, debida a *Nosema apis*, con el mismo órgano diana para la infección, aunque con diferente cuadro sintomatológico respecto a la anterior. Esta enfermedad, fundamentalmente el tipo C, es considerada en las zonas templadas del planeta, donde se desarrolla la apicultura profesional, una de las principales causas de la elevada mortalidad de abejas registrada en los últimos años, ya que *Nosema ceranae* es uno de los patógenos más prevalentes en estas zonas, y científicamente se ha demostrado su capacidad para afectar a la abeja individual y por consiguiente, a la colonia de abejas en condiciones de campo. *Nosema ceranae* consigue agotar los mecanismos de compensación y defensa de la colonia de abejas, hasta provocar el colapso de la misma, quedando finalmente un reducido número de abejas y la reina, situación conocida como despoblamiento.

Actualmente ambos tipos de nosemosis (A y C) se trataban con fumagilinao ácido acético.

20

La fumagilina está prohibida en Europa según la directiva europea 3/01/081 por lo que no es una solución posible para las colmenas europeas.

El ácido acético puede eliminar esporas del microsporidio de los cuadros de las colmenas, para lo que está descrito utilizar el ácido acético. " una solución de 60 por ciento se puede utilizar para este propósito, con aproximadamente 2 ml por volumen del litro de ser tratado. Aunque

estaríamos ante un método profiláctico y no terapéutico.

Por otro lado, el ácido tánico es un compuesto polifenólico soluble en agua que se encuentra de forma natural en muchas especies vegetales con una
5 función de defensa antimicrobiana. A diferentes concentraciones y condiciones alimentarias se ha visto que tiene propiedades saludables para el ser humano gracias a su actividad antimicrobiana o su capacidad antidiarreica. No se conoce el uso del ácido tánico puro como tal para el tratamiento de la nosemosis tipo C, debida a *Nosema ceranae*

10

Para que una sustancia determinada pueda ser utilizada vía oral en el control de algún agente patógeno en las abejas melíferas, es fundamental que esta sustancia sea aceptada por las abejas, esto es, que la consuman adecuadamente y que no resulte tóxica a las dosis que pueda tener un
15 efecto sobre el patógeno. Con la aplicación de la metodología descrita por las normas OECD (1998 y posteriores), se pueden determinar ambos aspectos. Esto es, determinar si la sustancia es o no tóxica para la abeja, y qué dosis máxima llega a consumir sin provocarle ningún tipo de problema.

20

Sin embargo, es necesario poder suministrarles la sustancia de forma controlada para poder asegurar que no se supera la dosis máxima. En mamíferos es sencillo de controlar, pues la dosificación es uno a uno. Sin embargo, en animales pequeños y numerosos como las abejas es
25 necesario poder ofrecer la sustancia de forma que la tomen por sí mismas y de forma controlada.

Pues bien, el objetivo de la presente invención es proteger el uso del ácido tánico para el tratamiento de la nosemosis en general y la nosemosis tipo c producida por *Nosema ceranae* en particular, así como desarrollar un jarabe para la dosificación del ácido tánico para abejas e insectos similares, debiendo señalarse que, al menos por parte del solicitante, se desconoce la existencia de ningún otro dispositivo que presente características técnicas iguales o semejantes a las que presenta el que ahora propone y según se reivindica.

10 **EXPLICACIÓN DE LA INVENCION**

El uso del ácido tánico para tratar la nosemosis en general y la tipo C en particular, en abejas así como el jarabe que contiene ácido tánico que la invención propone, se configura como una novedad dentro de su campo de aplicación, estando los detalles caracterizadores que lo distinguen convenientemente recogidos en las reivindicaciones finales que acompañan a la presente memoria descriptiva.

El jarabe preferentemente comprende entre 0,5 g/l y 12,5 g/l de ácido tánico y una mezcla de azúcar y agua. Más preferiblemente comprende entre 2 y 4 g/l de ácido tánico, preferiblemente 3,5 g/l de ácido tánico. La cantidad de azúcar es variable, siendo menos relevante, siempre que pueda atraer a las abejas. Los apicultores utilizan frecuentemente jarabes similares, por lo que no necesita una descripción detallada. En todo caso, más adelante se ofrecerán rangos preferidos.

Por lo tanto, la invención también se refiere al ácido tánico para la fabricación de un jarabe de tratamiento de la nosemosis por *Nosema ceranae* o *N. apis*, en abejas, y al uso del mismo.

- 5 El uso del ácido tánico así como el jarabe que contiene ácido tánico para el tratamiento de las nosemosis en general y la tipo C en particular, descrito consiste, pues, en un uso y un producto de características desconocidas hasta ahora para el fin a que se destina, razones que unidas a su utilidad práctica, la dotan de fundamento suficiente para obtener el privilegio de
- 10 exclusividad que se solicita.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 15 Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña a la presente memoria descriptiva, como parte integrante de la misma, un juego de planos en el que con carácter ilustrativo y no limitativo se ha representado lo siguiente:

- 20 La figura número 1.- Muestra una tabla del consumo de ácido tánico según la concentración de jarabe.

La figura número 2.- Muestra una tabla de la mortandad de las abejas según la concentración de jarabe.

25

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

Concretamente, lo que la invención propone, como se ha señalado anteriormente, es el uso del ácido tánico y un jarabe que contiene ácido
5 tánico para el tratamiento de las nosemosis A y C.

El jarabe que se pretende proteger está formado preferentemente por agua con un contenido alto de azúcares (entre 30 y 60% en peso), generalmente glucosa, azúcar o fructosa puros o combinados. Este jarabe lleva
10 incorporado una concentración de ácido tánico que preferiblemente está entre 0,5 g/l y 12,5 g/l. Más preferiblemente, la concentración será de entre 2 y 4 g/l, y aún más preferiblemente 3,5 g/l. Puede ser necesario añadir aminoácidos y vitaminas para facilitar la toma por parte de las abejas y suplir las carencias. Por ejemplo, los productos denominados “Promotor L”,
15 “Hidro rex vital” o “Apivitamol forte” disponibles comercialmente.

El objetivo es que cada abeja pueda consumir aproximadamente 100 µg al día, sabiendo que su consumo diario es de 15-25 µl de jarabe. La presencia de ácido tánico reduce el consumo de jarabe por parte de las abejas. Por
20 lo tanto, la dosis que reciben se mantiene razonablemente fija en ese rango de concentraciones. Más allá de 12,5 g/l las abejas dejan de consumir el jarabe, siendo este un dato muy relevante.

La preparación del jarabe puede realizarse en fábrica, justo antes del
25 suministro a las abejas o en el momento intermedio que se considere más conveniente.

Ejemplo 1.

Se introdujeron 25 abejas en varias jaulas, una como grupo de control o testigo (jarabe sin ácido tánico) y otras con diferentes jarabes con diferentes soluciones de ácido tánico (75 abejas para cada concentración). Todos los jarabes tenían 50% de azúcar. Se midió la cantidad de ácido tánico consumido para cada concentración a las 12, 48 y 72h, y la mortandad. El resultado se aprecia en las figuras 2 y 3.

Desde las dosis más bajas (0,5 g/l) hasta 4 g/l el consumo de jarabe fue muy alto, siendo muy similar a la cantidad consumida por las abejas en las jaulas testigo alimentadas solo con jarabe. En las dosis superiores se observó un rechazo del alimento. Los mayores consumos se observaron a 3,5 g/l y 4 g/l. La mortalidad de las abejas fue nula (similar a la de los testigos que reciben solo jarabe) hasta la dosis de 3,5 g/l que sería, por consiguiente, una dosis segura y bien aceptada por las abejas. Cantidades superiores poseen riesgo y sólo han de aplicarse en casos extremos, para cortar el brote e impedir el contagio.

La concentración de 3,5 g/l fue la concentración que mayor consumo por abeja tenía, ingiriendo más de 25 µl de tratamiento por abeja.

Ejemplo 2

Se utilizó la concentración de 3,5 g de ácido tánico por litro de jarabe ya que resultó la mejor opción con un mayor margen de seguridad. Los tratamientos se dispusieron ad libitum. El consumo y mortalidad fue

evaluado diariamente. Como control positivo de eficacia se utilizó fumagilina a una concentración de 120 mg/l siguiendo las recomendaciones de Higes et al., (2010).

- 5 Se tomaron varios cuadros de cría para obtener abejas de edad fija (± 1 día). Se confirmó la ausencia de *Nosema ceranae* en las abejas mediante un análisis por proteína C reactiva, PCR, de una muestra de 100 abejas seleccionadas al azar entre todas las nacidas.
- 10 La obtención de esporas frescas e infectivas de *N. ceranae* para la infección experimental de las abejas, se realizó mediante la metodología descrita por Higes y colaboradores ("*Experimental infection of Apis mellifera honeybees with Nosema ceranae (Microsporidia)*"). J Invertebr Pathol. 2007a; 94(3):211–7.).

15

Cada grupo experimental se componía de 3 jaulas de 25 Como marcan las prácticas científicas, se utilizó la fumagilina como testigo positivo a una dosis de 120 mg/l. Se incorporan además otros testigos como un grupoinfectado con *N. ceranae*, alimentado solo con jarabe, y un grupotestigo de abejas no infectadas para confirmar la ausencia de contaminación durante el ensayo.

20

A los 5 días post-infección se administraron las sustancias seleccionadas, ácido tánico y fumagilina, a las jaulas previstas, mezcladas en el alimento y a la dosis establecida. El tratamiento se mantuvo durante las 72 horas que duró en ensayo.

25

La evaluación de la eficacia de cada tratamiento realizó mediante la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) aplicada en 15 abdomenes de abejas (5 por cada jaula) a las 24, 48 y 72 horas post-tratamiento. Una vez
5 extraído el ADN se determinó la carga parasitaria, a las 24, 48 y 72 horas post-tratamiento, mediante el análisis por PCR cuantitativa (Roche Light Cycler® 480) determinando el valor del ciclo de amplificación Cp. Para ello se utilizaron dos parejas de cebadores que amplifican para un fragmento del gen que codifica para la proteína del túbulo polar 3 (PTP3) y para la
10 subunidad mayor de la ARN polimerasa II (RPB1).

Los valores de Cp obtenidos para la amplificación de ambos genes (PTP3 y RPB1) fueron muy similares en cada grupo, por lo tanto se trabajó con los datos del gen PTP3 de *N. ceranae*. No hubo diferencias estadísticamente
15 significativas en los datos obtenidos a las 24 y 48 horas, de manera que solo se detallan los obtenidos a las 72 horas.

El ciclo de amplificación en el que se detectó señal en qPCR varió entre las muestras. Las abejas de los grupos que recibieron ácido tánico y fumagilina, mostraron a las 72 horas de la aplicación de los tratamientos
20 unos valores de Cp significativamente superiores a los observados en testigo positivo con jarabe esto es el grupo infectado y no tratado. Esto indica que la carga parasitaria de las abejas de estos grupos (ácido tánico y fumagilina) era significativamente inferior al del testigo infectado y no
25 tratado

En las abejas del grupo testigo no infectado, se confirmó la ausencia de *N.*

ceranae, lo que valida la metodología experimental, y asegura la ausencia de sesgos por reinfección.

Este resultado de laboratorio confirma que la capacidad de inhibición del ciclo biológico de *N. ceranae* es similar entre las dos sustancias ensayadas, 5 fumagilina y ácido tánico, lo que sugiere que este último puede ser un candidato idóneo para su aplicación en condiciones de campo.

Ejemplo 3

10 Para evaluar si en condiciones de campo, en colmenas infectadas, se detecta el efecto del ácido tánico en jarabe, se suministró ácido tánico a 3,5 g/l a varias colmenas. Otras recibieron fumagilina, el vehículo o ningún alimento. Todas se observaron durante un año, de otoño a otoño, tras un tiempo de aclimatación.

15

El tratamiento fue de cuatro semanas en otoño o en primavera. Consistía en un total de 1000 ml de jarabe dividido en 4 dosis de 250 ml que se administraban semanalmente para cada producto. Cualquier cantidad no consumida se retiraba.

20

En primer lugar, se aseguró que estaban limpias de *N. ceranae*. Luego se situaron cerca de una colmena infectada para asegurar la propagación natural de la infección, tras lo que se retiró la colmena infectada. Se comprobó por PCR que todas las colmenas estaban infectadas (n>30 en 25 cada colmena), tras lo que se distribuyeron en dos campos separados 500 m. En otoño y primavera se realizaron tratamientos acaricidas (flumetrina y cumafós).

Se realizó una toma de muestras antes y después de cada periodo de tratamiento (otoño y primavera) para observar la evolución de la colmena. Se tomaron muestras de abejas pecoreadoras y de interior ($n > 30$ y $n > 25$ respectivamente). En esos puntos de muestreo se estudió la presencia de patógenos causantes de nosemosis (*N. ceranae* y *N. apis*) y los porcentajes de parasitación que son el indicativo de la carga parasitaria en la colonia de abejas y el indicativo de la gravedad de la nosemosis tipo c. Los patógenos se analizaron por PCR.

10

En las colmenas tratadas con ácido tánico en jarabe se observó una fuerte reducción del porcentaje de parasitación el tratamiento primaveral. No obstante, a partir del inicio de tratamiento otoñal se observa una reducción en la carga parasitaria de *N. ceranae* durante el estudio que fue estadísticamente significativo (T4: $p < 0,05$)

15

Las colmenas tratadas con ácido tánico presentaron un porcentaje de parasitación inferior al 10% a lo largo de todo el estudio, incluso inferior al del grupo tratado con fumagilina, lo que asegura que la colonia no sufrirá los efectos negativos debidos a la parasitación por *Nosema ceranae* que se pueden empezar a manifestar con porcentajes de parasitación de las abejas de inferior por encima del 40%.

20

Descrita suficientemente la naturaleza de la presente invención, así como la manera de ponerla en práctica, no se considera necesario hacer más extensa su explicación para que cualquier experto en la materia comprenda su alcance y las ventajas que de ella se derivan, haciéndose constar que,

25

dentro de su esencialidad, podrá ser llevada a la práctica en otros modos de realización que difieran en detalle de la indicada a título de ejemplo, y a las cuales alcanzará igualmente la protección que se recaba siempre que no se altere, cambie o modifique su principio fundamental.

5

REIVINDICACIONES

1.- Uso del ácido tánico para el tratamiento de las nosemosis, en particular de la tipo C debida a *Nosema ceranae*, en abejas.

5

2.- Uso del ácido tánico, según la reivindicación 2, para la preparación de un jarabe en una concentración de entre 2 y 4 g/l de ácido tánico.

3.- Uso, según la reivindicación 3, que comprende 3,5 g/l de ácido tánico.

10

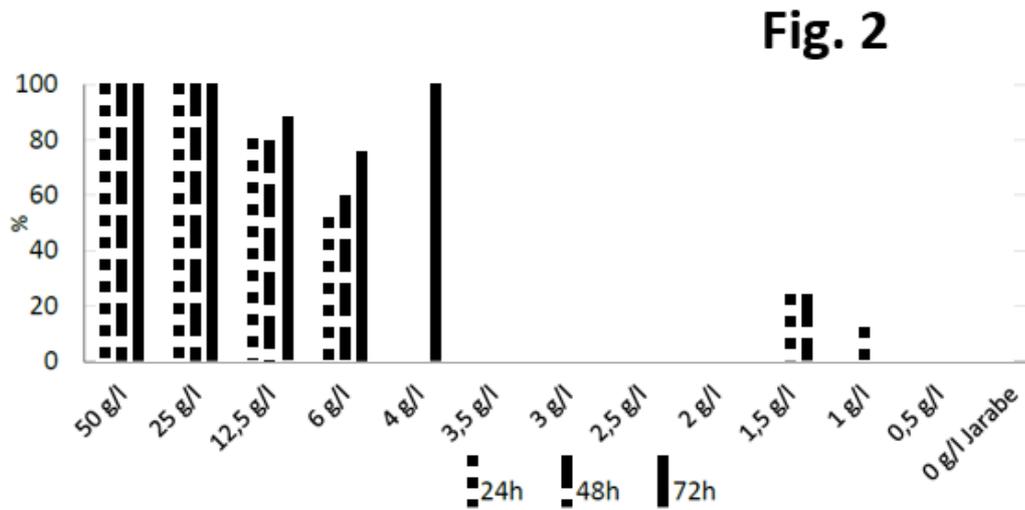
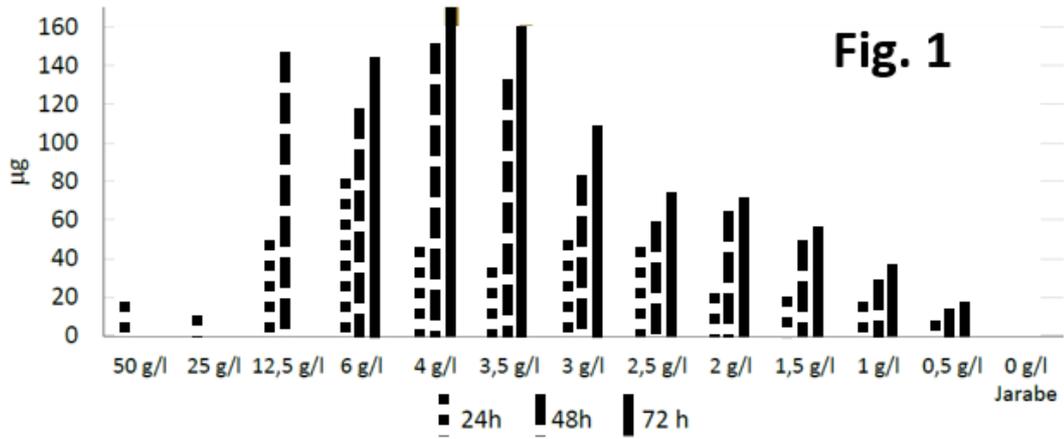
4.- Jarabe para el tratamiento de las nosemosis en general y de la tipo C, debida a *Nosema ceranae*, en particular **caracterizado** por el hecho de que comprende ácido tánico.

15 5.- Jarabe, según la reivindicación 4, que comprende entre 0,5 g/l y 12,5 g/l de ácido tánico y una mezcla de azúcar y agua.

6.- Jarabe, según la reivindicación 5, que comprende entre 2 y 4 g/l de ácido tánico.

20

7.- Jarabe, según la reivindicación 6, que comprende 3,5 g/l de ácido tánico.





- ②¹ N.º solicitud: 201730996
 ②² Fecha de presentación de la solicitud: 31.07.2017
 ③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: **A61K31/7024** (2006.01)
A61P31/10 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	RODRÍGUEZ-GARCÍA, C. et al. "Tratamientos con productos naturales para el control de la nosemosis de las abejas melíferas". III JORNADAS DOCTORALES DE LA UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA. Comunicaciones. https://books.google.es/books?id=LKeiCwAAQBAJ&pg=PT44&lpg=PT44&dq=tanini+castilla+la+mancha+nosemosis&source=bl&ots=ktwyJRNMMo&sig=MVUOmVVT-hEBgYXOVUBDrInea9Q&hl=es&sa=X&ved=0ahUKewjkmvKT1KfZAhWMDsAKHVWrdQoQ6AEIJzAA#v=onepage&q&f=false Albacete 2013, Páginas 44-45 [en línea][recuperado el 12.02.2018], todo el documento.	1-7
X	TLAK GAJGER, I. et al. "Effect of the herbal preparation NOZEVIT on the mid-gut structure of honeybees (<i>Apis mellifera</i>) infected whit <i>Nosema</i> sp. Spores". VETERINARNI MEDICINA, 2011, Vol. 56, Páginas 344-351, todo el documento especialmente página 349, último párrafo de la discusión.	1-4
A	MAISTRELLO, L. et al. "Screening of natural compounds for the control of nosema disease in honeybees (<i>Apis mellifera</i>)". APIDOLOGIE, 2008, Vol. 39, Páginas 436-445, <DOI: 10.1051/apido:2008022>, todo el documento.	1-7

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: 2-7

Fecha de realización del informe 15.02.2018	Examinador M. Novoa Sanjurjo	Página 1/2
---	--	----------------------

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

A61K, A61P

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, HCAPLUS, INTERNET