

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2017/149179 A1

(43) Fecha de publicación internacional
8 de septiembre de 2017 (08.09.2017) **WIPO | PCT**

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A61K 47/40 (2006.01) *A61P 23/00* (2006.01)
A61K 31/085 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2017/070108

(22) Fecha de presentación internacional:
27 de febrero de 2017 (27.02.2017)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201630258 4 de marzo de 2016 (04.03.2016) ES

(71) Solicitante: **UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA** [ES/ES]; Plaza Cronista Isidoro Valverde, s/n Ed. La Milagrosa, 30202 Cartagena (Murcia) (ES).

(72) Inventores: **GARCIA AYALA, Alfonsa**; Universidad de Murcia, Avda. Teniente Flomesta nº 5, 30003 MURCIA (ES). **LOPEZ CÁNOVAS, Amanda Esperanza**; Universidad de Murcia, Avda. Teniente Flomesta nº 5, 30003 MURCIA (ES). **LOPEZ GOMEZ, Antonio**; Universidad Politécnica de Cartagena, Plaza Cronista Isidoro Valverde, s/n Ed. La Milagrosa, 30202 CARTAGENA (Murcia) (ES). **MULERO MENDEZ, Victoriano, Francisco**; Universidad de Murcia, Avda. Teniente Flomesta nº 5, 30003 MURCIA (ES). **ROS CHUMILLAS, Maria**; Universidad Politécnica de Cartagena, Plaza Cronista Isidoro Valverde, s/n Ed. La Milagrosa, 30202 CARTAGENA (Murcia) (ES).

(74) Mandatario: **CARPINTERO LOPEZ, Mario**; Herrero & Asociados, S.L., Cedaceros, 1, 28014 Madrid (ES).

(81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Title: ANAESTHETIC SOLUTION AND METHOD OF USE THEREOF FOR ANAESTHETISING, STUNNING AND SLAUGHTERING FISH

(54) Título : SOLUCIÓN ANESTESIANTE Y SU MÉTODO DE APLICACIÓN PARA EL ANESTESIADO, ATURDIDO Y SACRIFICIO DE PECES

(57) Abstract: The invention relates to an anaesthetic solution comprising a natural anaesthetising agent (clove essential oil, isoeugenol and/or eugenol) nanoencapsulated in food-grade β -cyclodextrines, with a moisture content no greater than 14%, forming a water-soluble inclusion complex, wherein the proportion of natural anaesthetic in the inclusion complex is between 5 and 30%, the proportion of β -cyclodextrines being between 70 and 95% of the total mass of the complex. According to the invention the anaesthetising agent is formulated in freshwater, seawater, liquid ice or water with crushed ice, in a concentration between 5 and 60 mg/kg of water. The invention also relates to methods developed for anaesthetising, stunning and/or slaughtering fish, based on the use of the solution of invention.

(57) Resumen: Esta invención se refiere a una solución anestésica que comprende un agente anestésico natural (aceite esencial de clavo, isoeugenol y/o eugenol), nanoencapsulado en β -ciclodextrinas de uso alimentario, con un contenido de humedad no superior al 14%, formando un complejo de inclusión soluble en agua, donde la proporción del anestésico natural en el complejo de inclusión está comprendida entre el 5 y el 30%, la proporción de las β -ciclodextrinas entre el 70 y el 95%, de la masa total del complejo, en la que el agente anestésico se formula en agua dulce, agua de mar, hielo líquido o agua con hielo picado, en una concentración comprendida entre 5 y 60 mg/kg de agua. Asimismo se contemplan los métodos desarrollados para el anestesiado, aturdido y/o sacrificio de los peces basados en el empleo de la solución de la invención.



WO 2017/149179 A1

SOLUCIÓN ANESTESIANTE Y SU MÉTODO DE APLICACIÓN PARA EL ANESTESIADO, ATURDIDO Y SACRIFICIO DE PECES

DESCRIPCIÓN

Campo de la invención

La presente invención pertenece al campo de la tecnología de anestesiado en animales, en particular se refiere al aturdido y sacrificio de peces de acuicultura y de peces de experimentación, como, por ejemplo, la dorada, la lubina, la trucha, el salmón y el pez cebra. De forma más específica, la presente invención contempla una nueva solución anestésica para peces, basada en el empleo de aceites esenciales encapsulados en β -ciclodextrinas, formulados con hielo o agua. Asimismo se refiere a un método de anestesiado, aturdido y/o sacrificio de peces de acuicultura y experimentación basado en el empleo de dicha solución anestésica.

Antecedentes de la invención

Los peces de acuicultura y de experimentación, durante su ciclo de vida, pueden ser sometidos a toda una serie de situaciones de manejo que les puede producir estrés y sufrimiento. Por ejemplo, cuando se les captura con salabres y redes, durante su pesaje, clasificación, vacunación, transporte y, al final, durante su aturdido y sacrificio. Cuando se trata de peces de experimentación e investigación también pueden someterse a procedimientos quirúrgicos más o menos agresivos, como, por ejemplo, cuando son etiquetados, cuando se hace un muestreo, o cuando se hacen pequeñas incisiones o intervenciones más invasivas.

En este sentido, la EFSA (European Food Safety Authority), en su artículo "*Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare*" (*Opinión Científica del Panel sobre Salud y Bienestar Animal*) publicado en The EFSA Journal, 2009, 1010, 1-52 como "Question N° EFSA-Q-2008-441" y adoptada el 20 de Marzo de 2009, también

establece que las etapas pre-sacrificio, aplicadas inmediatamente antes de la muerte de los peces de acuicultura, tienen un impacto directo y negativo sobre el bienestar de los peces. Por ello, la EFSA pone de manifiesto la necesidad de desarrollar procedimientos adecuados para ser aplicados en esas etapas pre-sacrificio, y también durante el sacrificio, que eviten que los peces sufran un estrés excesivo. También, la EFSA, en la citada Opinión, destaca que todos los métodos de sacrificio utilizados actualmente a nivel comercial, en acuicultura, mantienen los peces durante tiempos excesivos de consciencia, normalmente de varios minutos, de modo que los peces son sometidos a elevados niveles de estrés y sufrimiento.

Tal como establecen los autores Zahl et al (*Zahl I.H., Samuelsen O., Kiessling A. (2012). Anaesthesia of farmed fish: implications for welfare. Fish physiology and biochemistry, 38(1): 201-218*), en todas las situaciones citadas anteriormente puede ser interesante el tratamiento con agentes anestésicos con el fin de reducir el sufrimiento y garantizar el bienestar de los peces.

En este sentido, se han utilizado distintos agentes anestésicos en peces, siendo los más utilizados la benzocaína (etil 4-aminobenzoato), la metacaina o metanosulfonato de tricaina (MS-222) (etil 3-aminobenzoato), el metomidato hidrocloreto o clorhidrato de metomidato (metil 3-(1-feniletil) imidazol-4-carboxilato hidrocloreto), el isoeugenol (2-metoxi-4-prop-1-enil-fenol), el 2-fenoxietanol y la quinaldina (2-metilquinolina). Al igual que el eugenol, el isoeugenol es uno de los constituyentes del aceite esencial de clavo, que es otro anestésico de peces ampliamente utilizado.

Los protocolos de anestesia de peces normalmente implican el uso de uno solo de estos agentes anestésicos, pero se pueden usar en combinación con analgésicos. Normalmente, el agente anestésico se dispersa o se disuelve en el agua y el pez lo absorbe principalmente a través de las branquias, aunque también lo puede absorber en pequeñas cantidades a través de la piel (*Zahl et al 2012*). El efecto anestésico es generalmente evaluado por medio del tiempo de inducción y el tiempo de recuperación, las reacciones reflejas a estímulos externos, y la capacidad de respuesta a la manipulación.

Según el artículo anterior de Zahl et al (2012), el progreso de la inducción y la profundidad de la anestesia generalmente se dividen en distintas etapas y «planos» (véase la Tabla 1 de este artículo, de Zahl et al 2012), que pueden ser caracterizados en animales mediante indicadores clínicos conocidos (comportamiento, actividad, reflejos corneales y tamaño de pupila, tono muscular, reflejos, frecuencia respiratoria, frecuencia cardíaca y presión arterial). Pero, como algunos de estos indicadores son difíciles de evaluar en los peces, puede ser muy complicado distinguir las etapas y “planos” citados anteriormente, sobre todo en situaciones en las que la inducción es rápida. Por ello, estas etapas son generalmente descritas mediante cambios en la actividad de natación, el equilibrio, la frecuencia respiratoria y reacciones a estímulos externos (ver la Tabla 1 del artículo de Zahl et al 2012, sobre las etapas de la anestesia en peces). De esta manera, en la mayoría de las evaluaciones o estudios comparativos de anestésicos en peces, éstos son anestesiados hasta conseguir una etapa determinada, que se corresponde normalmente con pérdida de equilibrio, actividad natatoria nula, falta de respuesta a estímulos externos y reducción o incluso parada de la respiración (que según la citada Tabla 1 del citado artículo de Zahl et al (2012), se correspondería con la etapa III, plano 3, acercándose incluso a la etapa IV) (Hoskonen P., Pirhonen J. (2004). *Temperature effects on anaesthesia with clove oil in six temperate-zone fishes*. *J Fish Biol* 64:1136–1142; Mattson N.S., Riple T.H. (1989). *Metomidate, a better anesthetic for cod (Gadus morhua) in comparison with benzocaine, MS-222, chlorbutanol, and phenoxyethanol*. *Aquaculture* 83:89–94; Mylonas C.C., Cardinaletti G., Sigelaki I., Polzonetti-Magni A. (2005). *Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (Dicentrarchus labrax) and gilthead sea bream (Sparus aurata) at different temperatures*. *Aquaculture* 246:467–481; Stehly G.R., Gingerich W.H. (1999). *Evaluation of AQUI-S (TM) (efficacy and minimum toxic concentration) as a fish anaesthetic sedative for public aquaculture in the United States*. *Aquaculture Research* 30:365–372; Sylvester J.R., Holland L.E. (1982). *Influence of temperature, water hardness, and stocking density on MS-222 response in three species of fish*. *Progress Fish Cultur* 44:138–141).

Según se desprende de los distintos trabajos de investigación citados anteriormente, el tiempo necesario de contacto de los peces con los agentes anestésicos citados es normalmente de varios minutos (de 2 a 15 minutos), para conseguir un adecuado

efecto anestésico (ver Tabla 2 del artículo de Zahl *et al*, 2012, sobre dosis y tiempos de exposición recomendados para los distintos agentes anestésicos de peces). Esto influirá en el estrés sufrido por los peces y en la calidad del producto final obtenido del pescado de acuicultura. En efecto, la bioquímica de la sangre y del músculo post mortem y el inicio del rigor mortis están influenciados por el método utilizado en el manejo pre-sacrificio, el aturdimiento o aturrido y el sacrificio de los peces que, a su vez, puede incidir negativamente en las cualidades organolépticas y comerciales del producto final, como puede ser el fileteado del pescado correspondiente de acuicultura (Zampacavallo G., Parisi G., Mecatti M., Lupi P., Giorgi G., Poli B.M. (2015). *Evaluation of different methods of stunning/killing sea bass (*Dicentrarchus labrax*) by tissue stress/quality indicators. Journal of food science and technology*, 52(5):2585-2597).

Por otro lado, la Normativa de producción ecológica (también denominada orgánica) en acuicultura (véase, por ejemplo, el REGLAMENTO (CE) No. 710/2009 DE LA COMISIÓN, de 5 de agosto de 2009), aunque no indica cuáles son las técnicas concretas que se han de utilizar, sí que establece que las técnicas de sacrificio deberán conseguir que los peces queden inmediatamente inconscientes e insensibles al dolor. Esto se puede interpretar como que son deseables aquellas técnicas que consigan anestésicar (o aturdir) y sacrificar a los peces en el menor tiempo posible, causando el menor estrés y sufrimiento posible. Pero, las técnicas más avanzadas de aturrido/sacrificio de peces, no consiguen tiempos reducidos para estas operaciones, por lo que el nivel de estrés que se produce es relativamente alto. Esto lleva a obtener una vida útil relativamente reducida en la conservación del pescado aturrido/sacrificado con estas técnicas, tal como pone de manifiesto el trabajo de Zampacavallo *et al* (2015).

En un estudio sobre este tema, tal como se describe en el artículo de Lerfall *et al* (Lerfall J., Roth B., Skare E.F., Henriksen A., Betten T., Dziatkowiak-Stefaniak M.A., Rotabakk B.T. (2015). *Pre-mortem stress and the subsequent effect on flesh quality of pre-rigor filleted Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during ice storage. Food Chemistry*, 175:157–165), se han obtenido resultados excesivos de estrés cuando el aturrido se hace con una mezcla de agua de mar y hielo picado (con una ratio de 1:1 en peso, y a una temperatura entorno a -0,3°C). Los citados autores (Lerfall *et al*,

2015) han puesto de manifiesto que los niveles de metabolitos en plasma y tejidos se ven afectados por el estrés inducido durante el aturdimiento y el sacrificio, lo que se traduce en un aumento significativo de los niveles de glucosa en sangre.

Además, de la filosofía de la producción ecológica de alimentos en general (también denominada producción orgánica, que incluye la agricultura y la acuicultura orgánica) se desprende el interés de evitar agentes químicos de síntesis tanto en la producción como en el aturdimiento y sacrificio. Por tanto, un anestésico deseable en acuicultura orgánica o ecológica sería el aceite esencial de clavo (AEC). Pero el uso de este anestésico tiene un problema y es su carácter lipofílico (es un aceite) y se disuelve mal en el agua. Esto lleva a la necesidad de usar elevadas dosis de este anestésico para que tenga un efecto en un tiempo relativamente corto. Por ejemplo, para el aturdimiento/sacrificio de lubinas, en el trabajo de investigación de Simitzis et al (*Simitzis P.E., Tsopelakos A., Charismiadou M.A., Batzina A., Deligeorgis S.G., Miliou, H. (2014). Comparison of the effects of six stunning/killing procedures on flesh quality of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus 1758) and evaluation of clove oil anaesthesia followed by chilling on ice/water slurry for potential implementation in aquaculture. Aquaculture Research, 45(11):1759-1770*) se propone una dosis de 105 mg/L de agua en el baño utilizado para el aturdimiento de estos peces.

Para aumentar la solubilidad en agua y la absorción por parte del pez del aceite esencial de clavo, y mejorar así su efecto anestésico, se podría utilizar este aceite esencial en combinación con ciclodextrinas, formando un complejo de inclusión. La inclusión de este aceite esencial de clavo en β -ciclodextrinas (β -CD) sí está estudiado, pero nunca se ha ensayado su efecto o su interés en el anestesiado o sacrificio de peces.

Sin embargo, sí que se ha propuesto el uso de agentes anestésicos para humanos en combinación con β -ciclodextrinas, formando complejos de inclusión. Así, la patente US 8,975,245 B2 (de 2015), de título "*Anaesthetic formulation*", pone de manifiesto el interés del uso de agentes anestésicos esteroides neuroactivos en combinación con ciclodextrinas, formando complejos de inclusión, pero para su uso en humanos, y no analiza el interés del uso del citado aceite esencial de clavo en combinación con β -ciclodextrinas para su uso en el anestesiado de peces.

El trabajo llevado a cabo por De Oliveira et al (*De Oliveira G.B., Guimarães A.G., Araújo A.S., Quintans S.S., Santos M.R.V., Quintans-Júnior L.J. (2015). Cyclodextrins: improving the therapeutic response of analgesic drugs: a patent review. Expert opinion on therapeutic patents*, 25(8):897-907) pone de manifiesto que las ciclodextrinas se pueden encontrar en al menos 35 productos farmacéuticos, como agentes anticancerígenos, o como fármacos analgésicos y anti-inflamatorios, de aplicación en humanos. Esto se corresponde con los resultados de varios estudios que han demostrado que los fármacos en forma de complejos de inclusión con ciclodextrinas podrían proporcionar beneficios en humanos en cuanto a solubilidad, estabilidad y también mejorar la respuesta farmacológica en comparación con el fármaco solo.

En la bibliografía está muy estudiada la formación de complejos de inclusión entre las ciclodextrinas y distintas moléculas. De esta manera, se consigue cambiar el comportamiento de estas moléculas, consiguiendo por ejemplo que sean más hidrosolubles. Las ciclodextrinas constituyen un grupo de oligosacáridos cíclicos naturales derivados del almidón con seis, siete u ocho moléculas de glucosa unidas por enlaces glicosídicos $\alpha(1-4)$ formando una estructura de forma cilíndrica, que se denominan α , β y γ -ciclodextrinas, respectivamente. La cavidad central de estas moléculas es hidrófoba, mientras que los bordes exteriores de las paredes que rodean esta cavidad son hidrófilas. Esta cavidad hidrofóbica forma complejos de inclusión con una amplia gama de moléculas huésped de tipo orgánico. Tal como establece el trabajo de Marques (*Marques H.M.C. (2010). A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. Flavour and Fragrance Journal*, 25(5):313-326), las ciclodextrinas pueden ser consideradas como agentes de nano-encapsulación y la formación del complejo ciclodextrina-huésped es equivalente a una encapsulación molecular, ya que las moléculas huésped se aíslan unas de otras y se dispersan a nivel molecular en una matriz de oligosacárido.

También, se pueden formar complejos de inclusión de aceites esenciales con ciclodextrinas (*Marques 2010*). Por ejemplo, el trabajo de Hernández-Sánchez et al (*Hernández-Sánchez P., López-Miranda S., Lucas-Abellán C., Núñez-Delicado E. (2012). Complexation of Eugenol (EG), as Main Component of Clove Oil and as Pure*

Compound, with β - and HP- β -CDs. Food and Nutrition Sciences, 3:716-723), estudia la asociación molecular entre β -CD, eugenol y aceite esencial de clavo, obteniendo complejos insolubles en agua, no aptos para su aplicación en el anestesiado de peces.

Los autores de la presente invención, a la luz de las necesidades del estado de la técnica en relación con los problemas derivados del anestesiado, aturdido y sacrificio de peces, han desarrollado una nueva formulación basada en el empleo de anestésicos naturales nanoencapsulados en β -ciclodextrinas, dando lugar a complejos de inclusión solubles en agua. Los complejos de inclusión así formados, se formulan con agua y/o hielo, dando lugar, de forma sorprendente, a soluciones con una concentración de agente anestésico muy reducida, en comparación con las empleadas en el estado de la técnica, e igualmente efectivas. Estas soluciones, aplicadas al anestesiado, aturdido y sacrificio de peces de acuicultura o experimentación, proporcionan así ventajas muy significativas respecto al estado de la técnica, ya que, además de disminuir la cantidad de agente anestésico, y por tanto los efectos no deseados derivados del mismo, permite una disminución significativa del sufrimiento animal, dado que el aturdimiento o pérdida de consciencia del animal se consigue en cuestión de pocos segundos, y el sacrificio se lleva a cabo con un sufrimiento mucho menor en comparación con los procedimientos actuales.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Niveles de lactato en sangre de dorada (mmol/L) en función del tipo de aturdimiento aplicado: **A)** agua de mar a temperatura ambiente (28-29°C) con AEC+ β -CD a distintas concentraciones (20, 40 y 60 mg/L); **B)** hielo líquido de agua de mar con AEC+ β -CD a distintas concentraciones, a -5°C. **C**=Hielo picado y agua de mar (1:1 en peso) a -0,5 °C, sin AEC; **AM-HL** = Hielo líquido de agua de mar (sin AEC); **AM-HL (20, 40)**= Hielo líquido de agua de mar con AEC+ β -CD (20, 40 mg/L).

Figura 2. Niveles de HCO_3^- en sangre de dorada (mmol/L) en función del tipo de aturdimiento aplicado. Se muestran resultados para tratamientos con agua de mar a temperatura ambiente (28-29°C) con distintas concentraciones de AEC+ β -CD (20, 40 y 60 mg/L); **C** = Hielo picado y agua de mar (1:1 en peso) a -0,5 °C, sin AEC.

Figura 3. Niveles de pCO₂ en sangre de dorada (mmHg) en función del tipo de aturdido aplicado. **C**=Hielo picado y agua de mar (1:1 en peso) a -0,5 °C; **AM-HL**=Hielo líquido de agua de mar, a -5 °C; **AM-HL (20, 40)**=Hielo líquido de agua de mar con AEC+β-CD (20 o 40 mg/L).

Figura 4. Niveles de glucosa en suero de dorada (ng/ml) en función del tipo de aturdido aplicado: **A)** agua de mar a temperatura ambiente (28-29°C) con AEC+β-CD a distintas concentraciones (20, 40 y 60 mg/L); **C**=hielo picado y agua de mar con AEC+β-CD (1:1 en peso) a -0,5 °C, sin AEC; **B)** hielo líquido de agua de mar con AEC+β-CD a distintas concentraciones, y a -5 °C; **AM-HL (0, 20, 40)**=Hielo líquido de agua de mar con AEC+β-CD (0, 20 o 40 mg/L).

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una nueva solución de un anestésico natural, basado en aceite esencial de clavo (AEC) y β-ciclodextrinas (β-CD), en combinación con agua, agua con hielo picado, o hielo líquido, para la realización del anestesiado, aturdido y sacrificio de peces de acuicultura y experimentación, tales como, por ejemplo, la dorada, la lubina, la trucha, el salmón y el pez cebra.

En una realización principal de la invención se contempla una solución anestésica (de aquí en adelante solución de la invención) que comprende un agente anestésico natural nanoencapsulado en β-ciclodextrinas, formando un complejo de inclusión soluble en agua. La proporción del anestésico natural en el complejo de inclusión está comprendida entre el 5 y el 30%, de la masa total del complejo, preferiblemente entre el 10 y el 20%, y la proporción de las β-ciclodextrinas en el complejo de inclusión está comprendida entre el 70 y el 95% de la masa total del complejo, preferiblemente entre el 80 y el 90%.

El agente anestésico se formula en agua dulce, en agua de mar, en hielo líquido (definido el hielo líquido como se establece en el artículo de *Kauffeld, M., Wang, M. J., Goldstein, V., Kasza, K. E. (2010). Ice slurry applications. International Journal of Refrigeration, 33(8), 1491-1505*, donde se denomina en inglés como "ice slurry"), o

en agua con hielo picado, en una concentración comprendida entre 5 y 60 mg/kg, preferiblemente entre 10 y 40 mg/kg, en función de la temperatura del agua (concentraciones equivalentes a mg de agente anestésico por kg de agua inicial).

El agente anestésico natural empleado en la solución de la invención es un aceite esencial, en particular el aceite esencial de clavo, y/o los componentes del mismo, como son el eugenol e isoeugenol.

Las β -ciclodextrinas utilizadas para la formulación anestésica objeto de esta invención deben ser de uso alimentario, catalogadas como aditivo alimentario que se denomina E-459. Deben tener aspecto de polvo blanco, sin olor, y deben tener una pureza mínima del 98% (en base anhidra), un contenido de humedad no superior al 14% (determinado por el método de Karl Fischer), preferiblemente entre el 1 y el 4%, y un contenido de otras ciclodextrinas no superior al 2% (en base anhidra). Su solución en agua debe ser incolora.

El contenido de humedad inferior al 14% de las β -ciclodextrinas empleadas en la formulación mejora significativamente la solubilidad en agua del complejo de inclusión formado correspondiente. En el rango 1-4% de humedad, la solubilidad del complejo es completa, con ausencia total de precipitados o partículas en suspensión en la solución.

La nanoencapsulación del aceite esencial en las β -ciclodextrinas se puede llevar a cabo mediante cualquiera de los siguientes métodos empleados en el estado de la técnica: método del amasado, método de co-precipitación (basado o no basado en solubilidad de fase), método de calentamiento en un envase o recipiente sellado, método de interacción gas (o vapor)-líquido, método de liofilización, método de atomización, o usando tecnología de fluidos supercríticos (tal como se describe en *Marques et al, 2010*).

En realizaciones particulares de la solución de la invención, el agente anestésico se formula en hielo líquido, donde el hielo se encuentra en una proporción comprendida entre el 20 y 70% en peso del total del peso de la mezcla de agua y hielo.

En otra realización particular de la solución de la invención, el agente anestésico se formula en agua con hielo picado, estando la proporción agua:hielo picado, en peso, comprendida entre 1:1, 1:2 y 1:3, o en una proporción intermedia a estas.

En otra realización principal de la invención se contempla el empleo de la solución de la invención para el anestesiado, aturdido y/o sacrificio de peces de acuicultura y de experimentación. El empleo de la solución en estas aplicaciones permite la disminución significativa del sufrimiento animal de estos peces, ya que el aturrido o pérdida de consciencia del animal se puede conseguir en cuestión de segundos, y el sacrificio se lleva a cabo con menos sufrimiento animal.

En base a estas aplicaciones, en otra realización principal de la invención se contempla un método para el anestesiado de peces de acuicultura y experimentación. Dicho método comprende los siguientes pasos:

- En primer lugar se prepara la solución anestésica contemplada en la invención formulada en agua dulce, a una temperatura comprendida entre 0 y 30 °C, en agua de mar, a una temperatura comprendida entre 0 y 30 °C, en hielo líquido, a una temperatura comprendida entre -8 y 0 °C, o en agua con hielo picado, a una temperatura comprendida entre -1 y 0 °C,
- Posteriormente, los peces, capturados mediante salabres o mediante bombeo, se sumergen en una de las soluciones preparadas, introduciendo, como máximo, tantos kilogramos de peces como kilogramos de solución.
- Se mantienen los peces sumergidos en la solución durante un tiempo comprendido entre 5 y 55 segundos, en función del tamaño y tipo de pez, y del tipo de solución utilizada, hasta que los peces muestran síntomas de estar anestesiados, como son pérdida de equilibrio, actividad natatoria nula, y falta de respuesta a estímulos externos.
- Finalmente, los peces se extraen de la solución de anestesiado.

En otra realización principal de la invención, se contempla un método para el aturdimiento y sacrificio de los peces, que comprende los siguientes pasos:

- en primer lugar, se prepara la solución anestésica de la invención formulada en hielo líquido, a una temperatura comprendida entre -8 y 0°C, o en agua con hielo picado, a una temperatura comprendida entre -1 y 0°C,
- posteriormente, los peces, capturados mediante salabres o mediante bombeo se sumergen en la solución obtenida, introduciendo como máximo, tantos kilogramos de peces como kilogramos de solución preparada para conseguir el aturdimiento de los mismos,
- los peces se mantienen unos 5-55 segundos, en función del tamaño y tipo de pez, y del tipo de solución utilizada, hasta que los peces muestran síntomas de estar aturdimientos o anestesiados, como son pérdida de equilibrio, actividad natatoria nula, y falta de respuesta a estímulos externos, y
- finalmente, para su sacrificio por hipotermia, los peces se extraen de la solución de aturdimiento y se introducen en agua con hielo picado (en una proporción agua:hielo, en peso, de 1:1, 1:2, 1:3, o en una proporción intermedia entre éstas), y a una temperatura comprendida entre -1 y 0°C, según se utilice agua de mar y hielo picado, o agua dulce y hielo picado o en hielo líquido, donde el hielo se encuentra en una proporción comprendida entre el 20 y 70% en peso del total del peso de la mezcla de agua y hielo, a una temperatura entre -8 y 0°C. Los peces se introducen, como máximo, en una proporción de tantos kilogramos de peces como kilogramos de solución (agua y hielo picado, o hielo líquido) hasta conseguir el sacrificio de los mismos. Una vez sacrificados, los peces se mantienen en el agua con hielo.

A continuación se recogen varios ejemplos, como modos no exclusivos de realización y aplicación de la invención, que ponen de manifiesto que se consigue disminuir considerablemente los tiempos de aturdimiento o anestesiado y se consigue, por tanto, reducir así el sufrimiento animal durante el aturdimiento y sacrificio de los peces de acuicultura o experimentación.

Ejemplos

Ejemplo 1

Material y metodología seguida

Para la realización de los distintos ejemplos prácticos de realización de la invención, se aplicaron distintos tratamientos de anestesiado o aturdido a un total de 30 doradas de acuicultura con un peso medio de 465.75 ± 102.12 g. Los peces una vez aturdidos fueron sacrificados a continuación en agua de mar con hielo picado (en una proporción 1:1, en peso).

Se analizó el efecto anestésico de distintas concentraciones de aceite esencial de clavo (AEC) incluido en β -CD (20, 40 y 60 mg/L) formulado:

- en agua de mar a temperatura ambiente (28-29 °C),
- en hielo líquido de agua de mar a -5 °C (60% de hielo), o
- en hielo picado más agua de mar (1:1) con una concentración de 20 mg/L de AEC incluido en β -CD, y a una temperatura de -0.5 °C.

El tratamiento control utilizado (denominado tratamiento **C** en las figuras 1-4) reproduce la técnica utilizada actualmente en la acuicultura industrial, que realiza el aturdimiento y el sacrificio por hipotermia en agua de mar con hielo picado (en una relación 1:1 en peso). Además, se analizó también el aturdimiento en hielo líquido a -5°C sin aceite esencial de clavo incluido en β -CD.

La nanoencapsulación o preparación del complejo de inclusión correspondiente (como complejo sólido), según una formulación o proporción de 14,28%/85,72% entre el aceite esencial de clavo y las β -CD, se llevó a cabo mediante el método del amasado (tal como describe con detalle Marques, 2010).

En cada tratamiento se analizaron un total de 4 peces, determinando parámetros visuales de comportamiento del pez y analíticos en respuesta al aturdido. Después del aturdido (caracterizado porque los peces muestran síntomas de estar anestesiados, como son pérdida de equilibrio, actividad natatoria nula, y falta de respuesta a estímulos externos) se extrajeron muestras de sangre de la vena caudal, utilizando litio heparina como anticoagulante, inmediatamente después del aturdido o anestesiado de cada individuo. Se realizó un análisis utilizando cartuchos desechables CG4 y un analizador de sangre i-STAT, midiendo lactato, $p\text{CO}_2$ (presión parcial de CO_2 en sangre), HCO_3^- , y glucosa, de acuerdo con el procedimiento seguido por Lerfall et al (2015).

Todos los tratamientos, experimentos y análisis sobre peces descritos anteriormente se llevaron a cabo de acuerdo con la aprobación de la Comisión de Ética de la Universidad de Murcia.

Resultados obtenidos

En cuanto a los niveles de lactato en sangre (mmol/L) (**Figura 1**), se observaron diferencias significativas entre los peces tratados con hielo picado y agua de mar (1:1) y agua de mar a 28-29°C a diferentes concentraciones de AEC+ β -CD (**Figura 1 A**). Se obtienen unos valores de lactato superiores en aquellos individuos aturridos con hielo picado y agua de mar sin anestésico (9,31-5,60 mmol/l) en comparación con aquellos tratados en agua de mar con distintas concentraciones de AEC+ β -CD (1,74-1 mmol/l, 3,88-0,36 mmol/l y 4,22-1,28 mmol/l en 20, 40 y 60 mg/L de AEC+ β -CD). También se apreciaron diferencias significativas entre los individuos aturridos a distintas concentraciones de AEC+ β -CD en hielo líquido a -5 °C (**Figura 1 B**). Así, se encontraron valores superiores de lactato en individuos que habían sido aturridos con hielo picado y agua de mar (1:1) sin agente anestésico. Así, se demostró que se alcanzan niveles de estrés más bajos cuando se aturden los peces en hielo líquido de agua de mar con unas concentraciones de anestésico de 40 mg/L (0,99-0,64 mmol/l).

Cuando se analizaron los resultados de HCO_3^- en sangre (mmol/L) (**Figura 2**) se observaron valores significativamente superiores en peces aturridos con hielo picado

y agua de mar (1:1), al compararse con aquellos individuos aturdidos con el anestésico a unas concentraciones de 20 y 40 mg/l, y a temperatura ambiente.

En lo que se refiere a los valores de pCO_2 en sangre (mmHg) (**Figura 3**), se observaron diferencias de valores medios obtenidos para aquellos peces aturdidos con unas concentraciones de AEC+ β -CD de 40 mg/L y en hielo líquido a -5 °C, si se comparan con el procedimiento tradicional de aturrido y sacrificio, que usa hielo picado en agua de mar (1:1) sin AEC (Tratamiento C).

Al comparar los niveles de glucosa (ng/mL) en suero de cada uno de los individuos de dorada (**Figura 4 A**), con tratamiento con AEC+ β -CD a diferentes concentraciones con agua de mar a temperatura ambiente (28-29 °C), no se observaron diferencias significativas entre ellos (**Figura 4 A**). No obstante, se observó una cierta tendencia a aumentar el nivel de glucosa al aumentar la dosis aplicada de anestésico (198,25 ng/mL a 20 mg/L de aceite de clavo; 226 ng/mL a 40 mg/L de aceite de clavo; y 318,5 ng/mL a 60 mg/L de aceite de clavo). En cualquier caso, el nivel de glucosa en sangre en la dorada siempre es menor cuando se utiliza la solución anestésica objeto de esta patente, si se compara con el aturrido con agua de mar con hielo picado (1:1). Por lo anterior, y en este caso, cuando se lleva a cabo el aturrido de dorada en agua de mar a temperatura ambiente, se propone utilizar la concentración más baja de AEC+ β -CD (20 mg/L). Este sería un método de interés en el anestesiado de peces de acuicultura o experimentación cuando no se quiere que tenga lugar el sacrificio de los mismos. Por otro lado, se aprecian diferencias significativas entre los individuos aturdidos con hielo líquido a -5°C (**Figura 4 B**) con y sin AEC+ β -CD, y los peces aturdidos con hielo picado y agua de mar (1:1) sin AEC+ β -CD. Los peces aturdidos con hielo líquido con AEC+ β -CD sufren menos estrés que los aturdidos en agua de mar y hielo picado (1:1).

En estos ejemplos de realización de la invención se observaron niveles significativamente más altos de lactato, pCO_2 , HCO_3 y glucosa en los ejemplares de dorada aturdidos con agua de mar y hielo picado (1:1) frente a aquellos aturdidos con el anestésico a base de AEC incluido en β -CD en hielo líquido a -5 °C, o a temperatura ambiente. Los menores valores de estos parámetros, que son indicadores de estrés del pez durante el aturrido, se corresponden con el hecho de

que cuando se utiliza la tecnología de aturrido y sacrificio objeto de esta patente, sobre dorada de acuicultura, se consiguen tiempos de aturrido de 10-15 s (en hielo líquido con AEC+ β -CD), o de menos de 55 segundos (en agua de mar con hielo picado, con AEC+ β -CD), frente a tiempos de más de 4 minutos obtenidos con agua de mar y hielo picado (1:1) sin AEC+ β -CD (que constituye el método tradicional de aturrido y sacrificio en acuicultura).

En estudios de otros autores (como el de *Lerfall et al 2015*) se han obtenido resultados similares de estrés cuando el aturrido se hace con agua de mar y hielo picado. Estos autores comprobaron que los niveles de metabolitos en plasma y tejidos se ven alterados por el estrés inducido en el salmón sacrificado con agua de mar y hielo picado (1:1), lo que se traduce, por ejemplo, en un aumento significativo de los niveles de glucosa en sangre, y en mayores niveles de lactato en sangre. También, los efectos del estrés observados por *Lerfall et al (2015)* en salmón relacionan la hipercapnia inducida con los altos niveles de pCO_2 y HCO_3 en los ejemplares aturridos y sacrificados con el método tradicional de aturrido y sacrificio que usa agua de mar y hielo picado.

Con estos ejemplos de realización de la formulación y métodos de aplicación de la nueva solución anestésica natural, objeto de esta patente, se demuestra que se consiguen tiempos de aturrido muy inferiores (de 10 a 55 segundos) en comparación con el método tradicional actual utilizado en acuicultura (agua con hielo picado, en una proporción 1:1 en peso). Por tanto, esta solución de anestésica natural y su método de aplicación del mismo para aturrido y sacrificio de peces también consigue menor sufrimiento y menos estrés en los peces, por lo que también contribuye a una mejora significativa de su bienestar animal.

Ejemplo 2

Ensayos de solubilidad

Para el desarrollo de estos ensayos de solubilidad se prepararon soluciones acuosas con tres concentraciones diferentes de aceite esencial de clavo (de 5, 10 y 15 mg/L) formando complejos de inclusión con dos tipos de β -CDs (nativas, no modificadas, y

de uso alimentario) que se caracterizan, entre otras cosas, por tener diferente contenido de humedad:

- A. β -CDs comercial, con un contenido de humedad del 14,5 %
- B. β -CDs de la invención, con un contenido de humedad del 4 %

Las β -CDs (B) con un 4% de humedad muestran una textura más pulverulenta que las de 14,5 % (A), siendo estas últimas de textura más granulosa.

El complejo de inclusión del aceite esencial de clavo con las β -CDs se preparó siguiendo el método del amasado indicado por *H.M.C. Marques [Marques H.M.C., 2010, "A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volátiles", *Flavour and Fragrance Journal*, 25(5), 313-326]*. El complejo de inclusión se obtuvo incorporando el aceite esencial de clavo (AEC) a las β -CDs según una relación equimolecular. Se empleó una relación peso:peso de 1 g de AEC por cada 6,90 g de β -CDs. Se realizaron los ensayos de solubilidad de estos complejos en 1 L de agua, utilizando las siguientes cantidades del complejo de inclusión formado:

- Para 5 mg/L de AEC en 1 L de agua se ensayó la disolución de 39,5 mg de complejo β -CD+AEC,
- Para 10 mg/L de AEC en 1 L de agua se ensayó la disolución de 79 mg de complejo β -CD+AEC, y
- Para 15 mg/L de AEC en 1 L de agua se ensayó la disolución de 118,5 mg de complejo β -CD+AEC.

Los ensayos de solubilidad se realizaron en laboratorio, a temperatura ambiente (20 °C), utilizando matraces con 1 L de agua, añadiendo las cantidades indicadas anteriormente de los complejos de inclusión obtenidos de AEC con las β -CDs (A y B), y con agitación magnética continua. La disolución de todos los complejos se realizó a la vez, en distintos matraces, manteniendo la agitación desde su adición a cada matraz con agua durante un tiempo de 2 horas.

Los resultados de solubilidad obtenidos, independientemente de la concentración de

AEC establecida, fueron dependientes de la cantidad de humedad inicial de las β -CDs utilizadas.

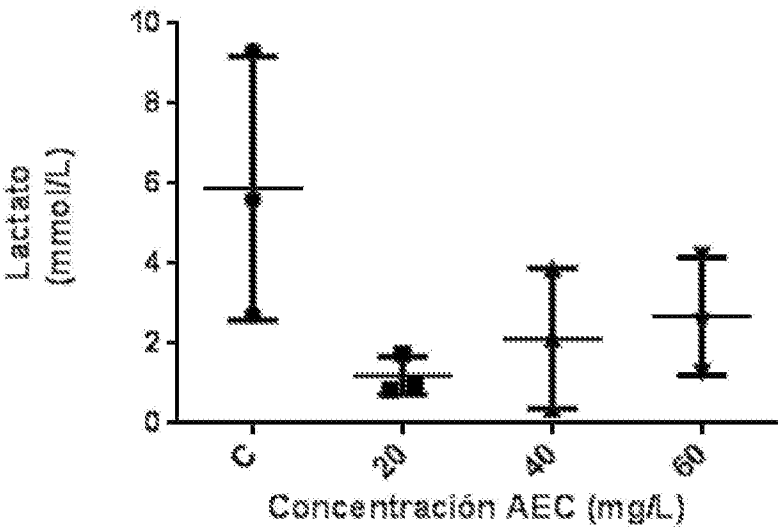
Tras los 30 minutos iniciales se pudo observar a simple vista una mejor disolución del complejo de inclusión β -CD+AEC con las β -CDs de la invención (B) con respecto a las comerciales (A). Transcurridas las 2 horas, se apreció a simple vista una disolución completa del complejo β -CD+AEC que utiliza β -CDs con un máximo del 4% de humedad (B), mientras que en los matraces con los complejos formados con β -CDs con un 14,5% de humedad (A) se observaron pequeñas partículas en suspensión. Cuando se detuvo la agitación y se dejó en reposo los matraces durante 5 horas, se pudo observar que las soluciones con los complejos con β -CDs de 14,5 % de humedad tenían precipitados en la base del matraz, mostrando una clara insolubilidad del complejo, para las tres concentraciones estudiadas de aceite esencial de clavo. Sorprendentemente, la solución que contenía el complejo de inclusión β -CD+AEC formado con β -CDs con un 4 % de humedad (B) no presentó ningún precipitado en el fondo de matraz, ni partículas en suspensión, lo que es indicativo de una adecuada solubilidad para las tres concentraciones ensayadas de aceite esencial de clavo (de 5, 10 y 15 mg/L) formando complejos de inclusión con las β -CDs.

REIVINDICACIONES

1. Solución anestésica que comprende:
 - un agente anestésico natural, seleccionado de entre aceite esencial de clavo, isoeugenol y/o eugenol,
 - β -ciclodextrinas de uso alimentario, formando un complejo de inclusión con el agente anestésico natural que es soluble en agua, y
 - agua, seleccionada de entre agua dulce, agua de mar, hielo líquido o agua con hielo picado,caracterizada porque la proporción del anestésico natural en el complejo de inclusión está comprendida entre el 5 y el 30% de la masa total del complejo, la proporción de las β -ciclodextrinas en el complejo de inclusión está comprendida entre el 70 y el 95% de la masa total del complejo, el agente anestésico se encuentra en una concentración comprendida entre 5 y 60 mg de agente anestésico/kg de agua y porque las β -ciclodextrinas tienen un contenido de humedad no superior al 14%.
2. Solución anestésica, según la reivindicación 1, donde la proporción del agente anestésico en el complejo de inclusión está comprendida entre el 10 y el 20% y la proporción de las β -ciclodextrinas entre el 80 y el 90%.
3. Solución anestésica, según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde el agente anestésico está en una concentración comprendida entre 10 y 40 mg de agente anestésico/kg de agua.
4. Solución anestésica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizada porque el agua empleada en la solución es hielo líquido, donde el hielo se encuentra en una proporción comprendida entre el 20 y 70% en peso del total del peso de la mezcla de agua y hielo.
5. Solución anestésica, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizada porque el agua empleada en la solución es agua con hielo picado, donde la proporción agua:hielo, en peso, está comprendida entre 1:1 y 1:3.

6. Uso de una solución anestésica, según las reivindicaciones 1-5, para el sacrificio de peces.
7. Método para el sacrificio de peces que comprende los siguientes pasos:
 - i) Preparar una solución anestésica de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, formulada en hielo líquido, a una temperatura comprendida entre -8°C y 0°C , o en agua con hielo picado, a una temperatura comprendida entre -1°C y 0°C ,
 - ii) Sumergir en la solución preparada en i), como máximo, tantos kilogramos de peces como kilogramos de solución,
 - iii) Mantener los peces sumergidos en la solución preparada en i) durante un tiempo comprendido entre 5 y 55 segundos, hasta el aturdimiento de los mismos,
 - iv) Extraer los peces aturdimientos de la solución,
 - v) Introducir los peces aturdimientos en agua con hielo, en una proporción agua:hielo en peso comprendida entre 1:1 y 1:3, y a una temperatura comprendida entre -1°C y 0°C , en una proporción, como máximo, de tantos kilogramos de peces como kilogramos de agua con hielo, hasta el sacrificio de los mismos.

A)



B)

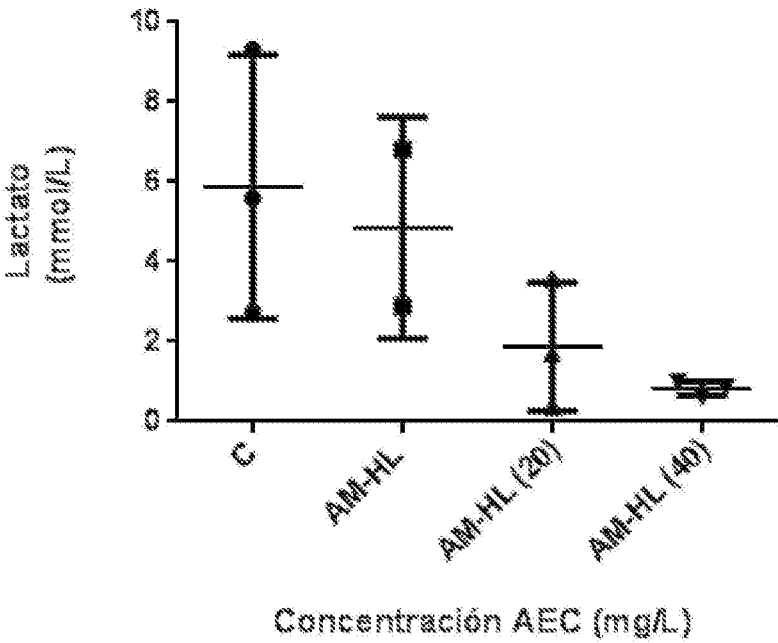


FIG. 1

2/4

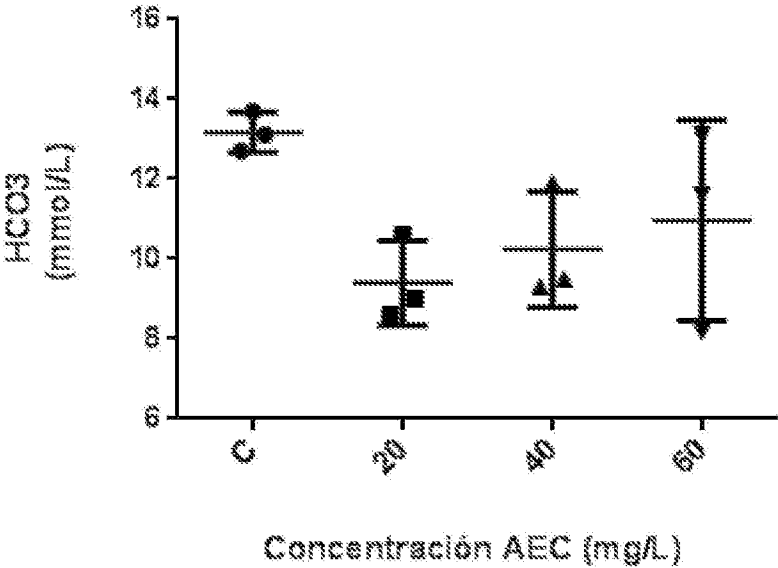


FIG. 2

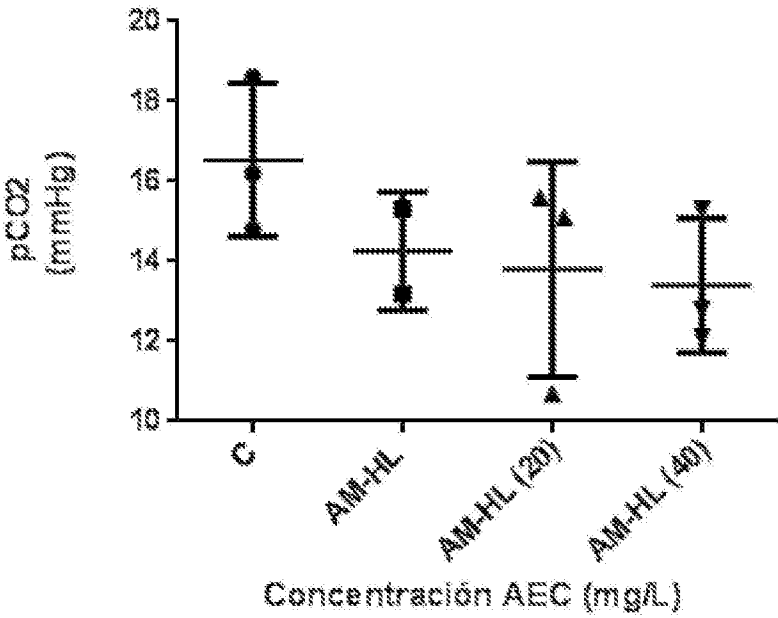
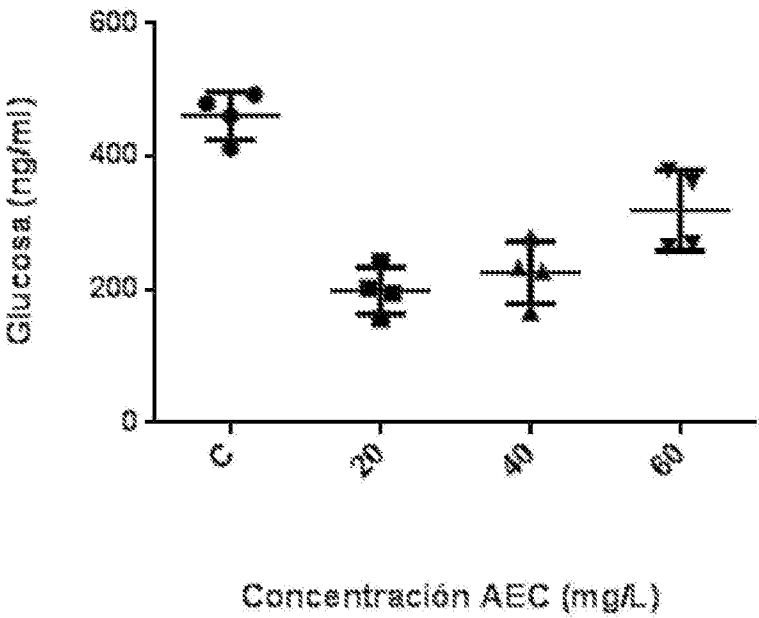


FIG. 3

4/4

A)



B)

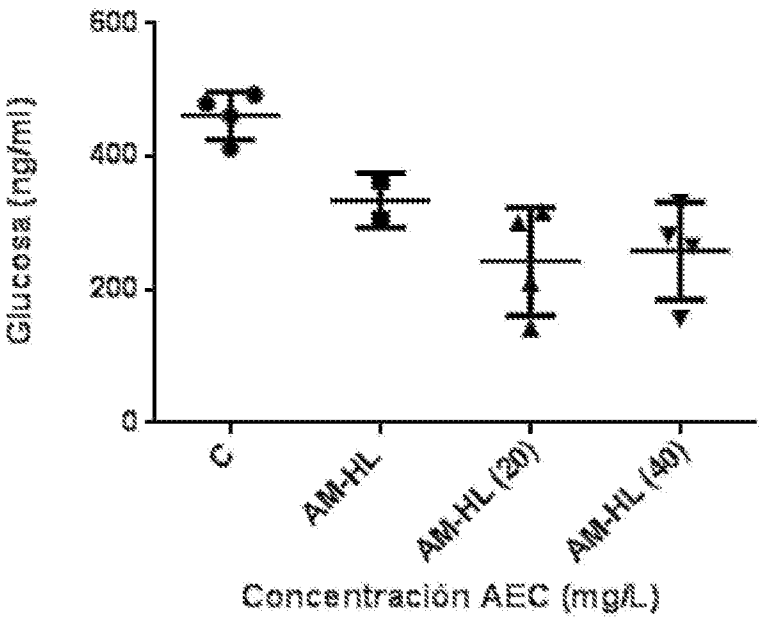


FIG. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2017/070108

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al. Complexation of Eugenol (EG) as Main Component of Clove Oil and as pure compound with beta- and HP-beta-CDs. Food and Nutrition Sciences, 2012, Vol. 3, Pages 716-723 Abstract and page 717, paragraph 2.2.1	1-7
A	AVMA Guidelines for Euthanasia of Animals, 2013 Page 70, point 4; page 71, paragraphs 6 and 6.2.3.	1-7
A	Web page of WACKER. Technical data sheet for CAVAMAX W7. 10/06/2014[online][Retrieved 29/05/2017] Retrieved from Internet: URL>http://www.wacker.com	1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
31/05/2017

Date of mailing of the international search report
(09/05/2017)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer
J. López Nieto

Telephone No. 91 3498426

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2017/070108

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K47/40 (2006.01)

A61K31/085 (2006.01)

A61P23/00 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2017/070108

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
A61K, A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

EPODOC, INVENES, WPI

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al. Complexation of Eugenol (EG) as Main Component of Clove Oil and as pure compound with beta- and HP-beta-CDs. Food and Nutrition Sciences, 2012, Vol. 3, Páginas 716-723 Resumen y página 717, punto 2.2.1	1-7
A	AVMA Guidelines for Euthanasia of Animals, 2013 Página 70, punto 4; página 71, puntos 6 y 6.2.3.	1-7
A	Página web de WACKER. Ficha técnica de CAVAMAX W7. 10/06/2014[online][Recuperado 29/05/2017] Recuperado de Internet: URL>http://www.wacker.com	1-7

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☐ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
31/05/2017

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
09 de mayo de 2017 (09/05/2017)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
J. López Nieto
Nº de teléfono 91 3498426

CLASIFICACIONES DE INVENCION

A61K47/40 (2006.01)
A61K31/085 (2006.01)
A61P23/00 (2006.01)