

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

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
3 de octubre de 2013 (03.10.2013)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2013/144394 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:

C08F 222/10 (2006.01) *C07C 69/78* (2006.01)
A23L 1/015 (2006.01) *C07D 309/30* (2006.01)
B01J 20/26 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2013/000082

(22) Fecha de presentación internacional:

22 de marzo de 2013 (22.03.2013)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P201200344 30 de marzo de 2012 (30.03.2012) ES

(71) Solicitante: **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID** [ES/ES]; Avda. Séneca, 2, 28040 - Madrid (ES).

(72) Inventores: **ORELLANA MORALEDA, Guillermo**; Facultad de Ciencias Químicas, Química Orgánica I., Ciudad Universitaria, 28040 - Madrid (ES). **MORENO BONDI, María Cruz**; Facultad de Ciencias Químicas, Química Orgánica I., Ciudad Universitaria, 28040 - Madrid (ES). **DELCALZO LÓPEZ, Ana Belén**; Facultad de Ciencias Químicas, Química Orgánica I., Ciudad Universitaria, 28040 - Madrid (ES). **URRACA RUIZ, Javier Lucas**; Facultad de Ciencias Químicas, Química Orgánica I., Ciudad Universitaria, 28040 - Madrid (ES). **AHMED GEBRIL ABOU HANY, Rahma**; Facultad de Ciencias Químicas, Química Orgánica I., Ciudad Universitaria, 28040 - Madrid (ES).

(74) Mandatario: **PLUMET ORTEGA, Joaquín**; Vicerrector De Investigación De La Universidad Complutense De Madrid, Avda. De Séneca, 2, 28040 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, 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, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

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

(54) Title: MATERIALS FOR SELECTIVE RECOGNITION OF *ALTERNARIA* MYCOTOXINS (ALTERNARIOL AND ALTERNARIOL MONOMETHYL ETHER)

(54) Título : MATERIALES PARA EL RECONOCIMIENTO SELECTIVO DE MICOTOXINAS DE *ALTERNARIA* (ALTERNARIOL Y ALTERNARIOL MONOMETIL ÉTER)

(57) Abstract: Alternariol and alternariol monomethyl ether are two of the toxins produced in greatest amounts by fungi of the family *Alternaria*. They occur frequently in foodstuffs and continued consumption thereof may have negative effects on human health and therefore it is important to develop effective detection methods that prevent the introduction of said organisms into the food chain. The present invention describes a method for preparing organic polymeric materials that act as selective alternariol and alternariol monomethyl ether adsorbents. As templates, the polymers use molecules with a structure similar to that of the mycotoxins, which are simple to prepare, robust and inexpensive. They may be used in the determination of alternariol mycotoxins present in water, foodstuffs, horticultural produce, fruits and derivatives (juices, musts, wines, etc.) and other matrices where the mycotoxins may be present.

(57) Resumen: El alternariol y el alternariol monometil éter son dos de las toxinas producidas en mayor grado por hongos de la familia *Alternaria*. Se encuentran con frecuencia en alimentos y su consumo continuado puede tener efectos negativos en la salud humana por lo que es importante el desarrollo de métodos de detección eficaz que evite su introducción en la cadena alimentaria. En esta invención se describe un método para la preparación de materiales poliméricos orgánicos que actúan como adsorbentes selectivos de alternariol y alternariol monometil éter. Los polímeros emplean como plantillas moléculas de estructura análoga a las micotoxinas, sencillas de preparar, robustas y baratas. Se pueden utilizar en la determinación de micotoxinas de *Alternariol* presentes en aguas, alimentos, hortalizas, frutos y derivados (zumos, mostos, vinos...) y otras matrices donde se puedan encontrar presentes.

WO 2013/144394 A1

TITULO

Materiales para el reconocimiento selectivo de micotoxinas de *Alternaria* (alternariol y alternariol monometil éter)

5

Objeto y campo de la invención

La invención se refiere a materiales capaces de reconocer y unir selectivamente micotoxinas y su método de preparación. De manera más
10 concreta, la invención se refiere a polímeros de impronta molecular para reconocer de forma selectiva las toxinas alternariol y alternariol monometil éter así como su método de preparación empleando moléculas análogas como plantillas.

15 Los polímeros objeto de la presente invención son útiles para la determinación de alternariol y alternariol monometil éter en aguas, hortalizas, frutas, alimentos, derivados y otras matrices donde se puedan encontrar presentes dichas toxinas.

20 **Estado de la técnica**

La existencia de hongos en alimentos mal almacenados (frutas, cereales, etc.) puede dar lugar a la presencia de toxinas que pasan inadvertidas en muchos alimentos. El consumo continuado de estos alimentos implica un
25 riesgo para la salud humana, por lo que es importante el desarrollo de métodos de detección y cuantificación de las mismas.

Las especies de hongos de la familia *Alternaria* producen un elevado número de metabolitos secundarios. Siete toxinas principales, que pertenecen a tres
30 clases estructurales diferentes, son conocidas como posibles contaminantes de alimentos con un riesgo toxicológico potencial. Éstas son: alternariol, alternariol monometil éter, altenueno, alterotoxinas I, II y III y ácido

tenuazónico. El alternariol (AOH) y el alternariol monometil éter (AME) son las micotoxinas más relevantes producidas por hongos *Alternaria*. Los hongos *Alternaria* a su vez, son los que más comúnmente se pueden encontrar en alimentos como granos de cereales, frutas y vegetales. Los tomates, por ejemplo, son uno de los productos más afectados por la contaminación con **AOH** y **AME**, pudiéndose encontrar niveles de **AOH** de 25 µg/kg y de **AME** de 5 µg/kg en pastas de tomate concentradas (S. Asam, K. Konitzer, M. Rychlik, *Mycotox. Res.* **2011**, 27, 23-28).

- 10 Los procedimientos de extracción de **AOH** y **AME** en métodos analíticos incluyen, por ejemplo, la extracción en fase sólida (SPE). Los métodos de determinación de dichas especies más empleados son la cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía de gases (GC) y, sobre todo, la cromatografía líquida (LC) con detección UV, fluorescente o electroquímica (V. Fernández
- 15 Pinto, en *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*, R. Barkai-Golan, N. Paster, Academic Press, 2008, capítulo 13, p. 271-278)

Actualmente, en la mayoría de casos, la determinación de **AOH** y **AME** se realiza mediante métodos cromatográficos que requieren de instrumentación

20 compleja y cara y personal especializado para su manejo.

Un método alternativo para su determinación es el empleo de inmunoensayos, recientemente descrito en la literatura (A. A. Burkin y G. P. Kononenko, *Appl. Biochem. Micro+*, **2011**, 47, 72–76; Y. Ackermann, V.

25 Curtui, R. Dietrich, M. Gross, H. Latif, E. Märklbauer, E. Usleber, *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59, 6360-6368), si bien requiere el empleo de sistemas biológicos de reconocimiento que son más difíciles y más caros de producir, menos estables y menos robustos que los polímeros sintéticos.

- 30 En la presente invención se describen soportes sólidos y materiales poliméricos en distintos formatos para la coordinación selectiva de **AOH** y **AME** como moléculas diana empleando polímeros de impronta molecular

(también denominados MIPs, del término en inglés *molecularly imprinted polymers*) como elementos de reconocimiento sintéticos.

5 En el documento WO 2011/031562 se describe la preparación de polímeros de impronta molecular para secuestrar o adsorber micotoxinas como compuestos diana. De forma más concreta, se describe la síntesis de moléculas plantilla análogas a ocratoxina A y esporidesmina.

Descripción de la invención

10

Los polímeros de impronta molecular son materiales que mimetizan en un cierto grado las propiedades de moléculas biológicas como los anticuerpos o las enzimas en cuanto a que poseen cavidades que son capaces de reconocer y enlazar selectivamente un cierto compuesto o familia de compuestos de estructura similar. Por esta razón se les conoce también como “*plasticuerpos*”, con la ventaja de que estos materiales se pueden obtener de forma más sencilla y, además, son más económicos y robustos, ya que poseen mucha mayor estabilidad físico-química que los receptores biológicos.

20 Los MIPs se preparan en presencia de la molécula que se quiere reconocer, en este caso, **AOH** o **AME**, de manera que durante la etapa de polimerización, los monómeros de partida se organizan alrededor de dicha molécula mediante interacciones reversibles. Una vez ha transcurrido la polimerización, el material se lava minuciosamente con el disolvente apropiado para la extracción de la molécula plantilla, quedando cavidades en el material que son complementarias en tamaño, forma y propiedades químicas al analito. Este material con cavidades selectivas se puede utilizar entonces para la extracción (o preconcentración) de la molécula de interés presente en una muestra compleja. Desarrollando el procedimiento adecuado, el soporte polimérico puede utilizarse también para su aplicación en sensores.

25

30

Hay ocasiones en las que no es conveniente utilizar el propio analito a determinar como molécula plantilla en la síntesis de MIPs, ya que puede tratarse de una sustancia tóxica, peligrosa o muy cara (normalmente se requieren cantidades del orden de 10 mg a 1 g para preparar una serie completa de polímeros de ensayo y muchísimo más si se trata de una producción industrial). En estos casos, se recurre al empleo de moléculas análogas o *sucedáneas*, que imitan en el mayor grado posible las propiedades estructurales y químicas de la molécula diana, pero que son menos peligrosas o más sencillas de preparar.

10

En este caso, tanto el **AOH** como **AME** son compuestos tóxicos y de un elevado precio. Por otro lado, la síntesis completa del **AOH** no es un procedimiento conveniente, ya que se trata de una compleja síntesis en 7 pasos (K. Koch, J. Podlech, E. Pfeiffer, M. Metzler, *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 3275-3276).

15

El empleo de moléculas sucedáneas tiene una ventaja adicional. En ocasiones la plantilla utilizada durante la síntesis de los MIPs no puede ser extraída o lavada del material completamente, y el residuo que permanece unido al polímero puede ir liberándose gradualmente durante su uso o aplicación analítica posterior. Esto supone una grave interferencia en las medidas analíticas. Al utilizar moléculas distintas a **AME** ó **AOH**, se puede evitar el problema, ya que presentarán distintos tiempos de retención en cromatografía, o propiedades ópticas diferenciadas. Por ejemplo, en esta invención se preparan y utilizan moléculas plantilla análogas a **AOH** y **AME** que no tienen una estructura rígida (**S2-AME** y **S2-AOH** en la Figura 2 o sus sales resultantes del tratamiento de la molécula plantilla con uno o más equivalentes de base capaz de reaccionar con grupos hidroxilo fenólicos como, por ejemplo, una sal de amonio cuaternario) y, por tanto, no son fluorescentes, con lo que se elimina la fluorescencia residual en el caso de un polímero en el que no se hubiese extraído cuantitativamente la micotoxina tras la preparación del mismo.

25

30

En la presente invención se describe la preparación de polímeros de impronta molecular selectivos para el reconocimiento o extracción de **AOH** y **AME** empleando moléculas sucedáneas para la impronta de los polímeros en lugar de **AOH** o **AME**. Estas moléculas sucedáneas son muy sencillas de preparar a escala cuantitativa de gramos (Figura 2). Las plantillas se preparan siguiendo procedimientos similares a los descritos en la bibliografía (H. Ito, A. Iguchi, T. Hatano, *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 393–400) con algún tipo de mejora. Por ejemplo, en la preparación de los compuestos **S1-AOHa-d** se procede a la desmetilación de los sustituyentes $-OCH_3$ mediante el empleo de un tiol y $AlCl_3$. Se ha descrito en la bibliografía que la mezcla etanotiol- $AlCl_3$ es un agente desmetilante muy activo (M. Node, K. Nishide, K. Fuji, E. Fujita, *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 4275-4277). Sin embargo, en lugar de etanotiol (altamente volátil y de olor muy intenso y desagradable), en este caso se emplea dodecanotiol, de olor apenas perceptible y que sigue ofreciendo buenos rendimientos de desmetilación (M. Node, K. Kumar, K. Nishide, S. Ohsugi, T. Miyamoto, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 9207-9210).

En esta invención, se describen y emplean también moléculas plantilla sucedáneas de **AOH** y **AME** no rígidas. Las estructuras **S2-AME** y **S2-AOH** mostradas en la Figura 3, se proponen como plantillas no fluorescentes para minimizar la fluorescencia residual de fondo que proporcionarían moléculas sucedáneas no lavadas del MIP en la etapa de remoción minuciosa de la plantilla utilizada para su preparación.

Estos receptores artificiales de **AOH** y **AME** se pueden usar en la determinación de dichos compuestos en aguas, hortalizas, frutas y derivados (zumos, mostos, vinos...) y otras matrices complejas donde se puedan encontrar presentes dichas toxinas.

Como monómeros funcionales de carácter ácido para el reconocimiento de grupos básicos (ver figura 4) se pueden emplear, por ejemplo, ácido metacrílico (MAA), ácido acrílico (AA), ácido trifluorometacrílico (TFM) o el

ácido *p*-vinilbenzoico (PVB), entre otros, o monómeros funcionales de carácter básico para el reconocimiento de grupos ácidos como, por ejemplo, la 2-vinilpiridina (2-VP), 4-vinilpiridina (4-VPY), *N,N*-dietil-2-aminoetil metacrilato (DAEM), 2-aminoetil metacrilato (AEM), 2-aminoetil metacrilamida (EAMA), etc. También es posible utilizar monómeros de carácter neutro para el reconocimiento molecular tales como el 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA), la acrilamida (AM), metacrilamida (MAM) y monómeros basados en ureas 1,3-disustituidas (ver figura 4), entre otros.

En la presente invención los monómeros entrecruzantes incluyen, preferentemente, etilenglicol dimetacrilato (EDMA), divinilbenceno (DVB), diisopropenilbenceno (DIB), trimetilolpropanotrimetacrilato (TRIM), pentaeritritoltriacrilato (PETRA), etilenbisacrilamida (EBA), piperazinilbisacrilamida (PBA) y metilenbisacrilamida (MBA).

En la presente invención se utilizan preferentemente como iniciadores compuestos azo *N,N'*-disustituídos tales como azo-*N,N'*-bisisobutironitrilo (AIBN), azo-*N,N'*-bisdimetilvaleronitrilo (ABDV), 2,2'-azobis-(2,4-dimetil-4-methoxivaleronitrilo) (V70) o cualquier otro azo iniciador cuya descomposición tenga lugar a la temperatura de polimerización deseada (comercializados, por ejemplo, por Wako Pure Chemical Ind. Ltd., Japón; o iniciadores redox como por ejemplo el persulfato amónico, con o sin aceleradores añadidos (como por ejemplo la tetrametiletilendiamina o TEMED).

Ejemplos de disolventes utilizados en la reacción de polimerización (también denominados porógenos frecuentemente en la bibliografía) son el agua, metanol, etanol, tetrahidrofurano (THF) acetona, dimetilformamida (DMF), acetonitrilo (MeCN), 1,1,1- tricloroetano, cloroformo, diclorometano, tolueno, dimetilsulfóxido (DMSO), isopropanol y cualquier mezcla de estos u otros disolventes.

Los MIPs pueden prepararse en distintos formatos tales como partículas

porosas, nanofibras, nanotubos, monolitos, nanopartículas y sus derivados tales como nanopartículas núcleo-recubrimiento ("*core-shell*") con posibles propiedades ópticas o magnéticas, con núcleos luminiscentes o incorporando sobre ellas moléculas especializadas que permitan una fácil detección (e.g. sondas moleculares luminiscentes). Estos polímeros además pueden ser modulados para ofrecer mejores propiedades físicas o químicas como pueden ser la adsorción o la porosidad. Además, los polímeros también pueden ser sintetizados en forma de partículas mediante técnicas que incluyan polimerizaciones líquido-líquido, o sistemas de dos fases como polimerización por suspensión, emulsión o variantes de estas (e.g. polimerización por miniemulsión), o de un solo líquido como polimerización por dispersión o precipitación.

Otra forma de polimerización utilizada preferentemente es la polimerización radicalica controlada (CRP). Esta bien conocida técnica se distingue en sí misma de la polimerización convencional por el tiempo de vida de la propagación de los radicales. Según este método, la polimerización puede llevarse a cabo durante varias horas permitiendo la generación de polímeros de pesos moleculares bien definidos, con baja polidispersidad y composición y funcionalidad controladas. Esto permite a los MIPs poseer mayor afinidad, capacidad y mayor asociación/disociación con el **AOH y AME**.

Bajo otra consideración las partículas se pueden producir mediante la técnica de injerto obteniendo una película sobre un soporte. El injerto puede ser llevado a cabo bajo las técnicas de "anclado a" ("*grafting to*") o "crecido desde" ("*grafting from*") mejorando normalmente ésta última el reconocimiento molecular y las propiedades cinéticas de los materiales (US Patent No. 6,759,488).

Bajo otra consideración, la síntesis de nanopartículas puede llevarse a cabo en el intervalo normal de 10 nm – 500 nm. El proceso de obtención de éstas puede realizarse vía polimerización por precipitación o mini-emulsión (V.

- Mittal, *Miniemulsion Polymerization Technology*, Wiley, Hoboken, New Jersey, 2010), donde se obtienen partículas uniformes por alta dilución con un disolvente en un solo paso. Sistemas acuosos o no acuosos pueden ser utilizados para ambos métodos. Además, pueden obtenerse partículas
- 5 esféricas en el intervalo 500 nm – 75 μ m por precipitación, emulsión o llevando a cabo la polimerización en el interior o exterior de partículas que sirvan como molde, e.g. uso de partículas esféricas de gel de sílice de tamaño definido que se rellenan de con el polímero MIP.
- 10 Finalmente las partículas de MIP también pueden ser post-funcionalizadas con el propósito de hacerlas más biocompatibles. De este modo pueden ser modificadas para proporcionar una máxima compatibilidad en sistemas biológicos acuosos, recubriendo la partícula con una membrana hidrofílica.
- 15 Alternativamente las partículas de MIPs pueden ser utilizadas en métodos similares a los ya bien establecidos como inmunoensayos, donde el anticuerpo puede ser sustituido por un MIP. Aparte de sobre partículas magnéticas, los MIPs pueden ser sintetizados con “sondas” o “marcadores” que faciliten la detección. Estas sondas son como las que pueden utilizarse
- 20 en inmunoensayos, por ejemplo enzimas, isótopos radioactivos o complejos de rutenio luminiscentes u otras moléculas fluorescentes.

Descripción de las figuras

- 25 En la figura 1 se representan las estructuras químicas del alternariol (AOH) y alternariol monometil éter (AME).

La figura 2 muestra la síntesis de las moléculas análogas S1-AMEa-d y S1-AOHa-d.

30

La figura 3 muestra la síntesis de las moléculas análogas S2-AME y S2-AOH.

En la figura 4 se representan las estructuras de los monómeros funcionales y entrecruzantes.

La figura 5 muestra los cromatogramas de extractos de zumo de manzana a un nivel de concentración de 0,05 mg/mL antes (línea continua) y después (línea discontinua) del proceso de extracción en fase sólida utilizando un polímero de impronta molecular (MIP) para el reconocimiento de alternariol. El pico de alternariol (AOH) está indicado en la figura.

10 Modo de realización de la invención

La realización de la presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos que no son limitativos de su alcance.

15 Ejemplo 1

Síntesis de **3-hidroxi-8,9-dimetoxi-6H-dibenzo[b,d]piran-6-ona (S1-AMEa)**.

En un matraz de fondo redondo de dos bocas se disuelve ácido 2-bromo-4,5-dimetoxibenzoico comercial (0,95 g, 3,6 mmol) y resorcinol comercial (0,93 g, 8,4 mmol) en 4,25 mL de hidróxido sódico acuoso (0,339 g, 8,4 mmol) y se calienta a 80 °C durante 30 min. Se añade una disolución de CuSO₄ al 5% (m/v) (1,45 mL). Después de 10 min se forma un precipitado. La mezcla de reacción se neutraliza añadiendo 0,9 mL de ácido clorhídrico concentrado y el sólido formado se filtra a vacío. Después de lavar con 5 mL de agua y 3 mL de metanol, el sólido se suspende en 10 mL de metanol y se calienta a 50 °C durante 10 min. Se deja enfriar a temperatura ambiente y el sólido se recupera por filtración y lavado con éter dietílico. Rendimiento: 71%.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 3.92 (s, 3H, -OCH₃), 4.05 (s, 3H, -OCH₃), 6.77 (d, J = 2.81 Hz, 1H, Ar-H), 6.88 (dd, J₁ = 8.69 Hz, J₂ = 2.33 Hz, 1H, Ar-H), 7.57 (s, 1H, Ar-H), 7.72 (s, 1H, Ar-H), 8.24 (d, J = 8.24 Hz, 1H, Ar-H), 10.58

(s, 1H, -OH) ppm; **FT-IR** (MeOH): 3265 (γ OH), 2979, 2834, 1691, 1626, 1520, 1464, 1371, 1130, 1085, 811, 682 cm^{-1} ; **MS-ESI** (negativo), m/z ; calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{O}_5$, $[\text{M}-\text{H}]^-$: 271.1; encontrado: 270.7.

5 Ejemplo 2

Síntesis de **3,8,9-trihidroxi-6H-dibenzo[b,d]piran-6-ona (S1-AOH-a)**.

Se pesa AlCl_3 comercial (0,786 g, 5,8 mmol) en un matraz de fondo redondo de dos bocas y se suspende en una disolución de dodecanotiol (0,5 mL) y clorobenceno (8,5 mL) mantenidos en un baño de hielo bajo argón. La suspensión se agita y se añade el compuesto **S1-AMEa** (0,337 g, 1,2 mmol). Después de media hora se retira el baño de hielo y la mezcla se mantiene a temperatura ambiente durante otra media hora, tras lo que se calienta a 100 °C. La reacción se sigue por cromatografía en capa fina (sílica, CH_2Cl_2 -MeOH 20:1 v/v). Después de 5 h, la mezcla se vierte sobre 15 mL de ácido clorhídrico acuoso al 3% (p/v) en un baño de hielo y el precipitado que se forma se filtra con un embudo Büchner y se lava con agua y unos pocos mL de metanol. Rendimiento: 72%.

20

^1H NMR: (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 6.72 (d, $J = 2.34$ Hz, 1H, Ar-H), 6.82 (dd, $J_1 = 8.64$ Hz, $J_2 = 2.37$ Hz, 1H, Ar-H), 7.47 (s, 1H, Ar-H), 7.53 (s, 1H, Ar-H), 7.88 (d, $J = 8.82$ Hz, 1H, Ar-H), 10.13 (s, 3H, -OH) ppm; **FT-IR** (MeOH): 3363 (γ OH), 2924, 1762, 1618, 1459, 1120, 1015, 811, 729 cm^{-1} ; **MS-ESI** (negativo), m/z ; calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_7\text{O}_5$, $[\text{M}-\text{H}]^-$: 243.0; encontrado: 242.7.

25

Ejemplo 3

Síntesis de **3-hidroxi-9-metoxi-6H-dibenzo[b,d]piran-6-ona (S1-AME-b)**.

30

En un matraz de fondo redondo de dos bocas se disuelve ácido 2-bromo-4,5-dimetoxibenzoico comercial (2,00 g, 8,6 mmol) y resorcinol comercial (2,00 g,

18 mmol) en 9,1 mL de una disolución acuosa de hidróxido sódico (0,727 g, 18,1 mmol) y la disolución se calienta a 80 °C durante 30 min, tras lo cual se añade una disolución de CuSO₄ al 5% (*m/v*) (3.6 mL). Después de 10 min se forma un precipitado. La mezcla de reacción se neutraliza añadiendo 1.9 mL de ácido clorhídrico concentrado y el sólido formado se filtra a vacío. Después de lavar con 5 mL de agua y 3 mL de metanol, el sólido se suspende en 10 mL de metanol y se calienta a 50 °C durante 10 min. Se deja enfriar a temperatura ambiente y el sólido se recupera por filtración y lavado con éter dietílico. Rendimiento: 59%.

10

¹H NMR: (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 3.93 (s, 3H, -OCH₃), 6.79 (d, *J* = 2.25 Hz, 1H, Ar-*H*), 6.87 (dd, *J*₁ = 8.66 Hz, *J*₂ = 2.33 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.54 (dd, *J*₁ = 8.87 Hz, *J*₂ = 2.78 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.64 (d, *J* = 2.73 Hz, 1H, Ar-*H*), 8.14 (d, *J* = 8.73 Hz, 1H, Ar-*H*), 8.26 (d, *J* = 8.91 Hz, 1H, Ar-*H*), 10.27 (s, 1H, -OH) ppm; FT-IR (MeOH): 3635 (γ OH), 2839, 1767, 1625, 1246, 1126, 811, 729 cm⁻¹; MS-IE (negativo), *m/z*; calculado para C₁₄H₉O₄, [M-H]⁻: 241.1; encontrado: 240.7.

15

Ejemplo 4

20 Síntesis de 3,9-dihidroxi-6*H*-dibenzo[*b,d*]piran-6-ona (S1-AOH-b).

Se pesa AlCl₃ (0,700 g, 5,2 mmol) en un matraz de fondo redondo de dos bocas y se suspende en una disolución de dodecanotiol (0,5 mL) en clorobenceno (8,5 mL) en un baño de hielo bajo argón. La suspensión se agita y se añade el compuesto S1-AMEb (0,300 g, 1,2 mmol). Después de media hora se retira el baño de hielo, se mantiene a temperatura ambiente durante otra media hora y después se calienta a 100 °C. La reacción se sigue por cromatografía en capa fina (sílica, CH₂Cl₂-MeOH 20:1 *v/v*). Después de 5 h, la mezcla se vierte sobre 15 mL de ácido clorhídrico acuoso al 3% (*p/v*) en un baño de hielo y el precipitado que se forma se filtra con un embudo Büchner y se lava con agua y unos pocos mL de metanol. Rendimiento: 70%.

30

¹H NMR: (300 MHz, DMSO-d₆) δ: 6.75 (d, *J* = 2.37 Hz, 1H, Ar-*H*), 6.83 (dd, *J*₁ = 8.67 Hz, *J*₂ = 2.37 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.34 (dd, *J*₁ = 8.7 Hz, *J*₂ = 2.69 Hz, 1H, Ar-*H*), 7.53 (d, *J* = 2.64, 1H, Ar-*H*), 8.05 (d, *J* = 8.76 Hz, 1H, Ar-*H*), 8.14 (d, *J* = 8.85 Hz, 1H, Ar-*H*), 10.21 (s, 2H, -OH) ppm; **FT-IR** (MeOH): 3743 (γ OH), 3320, 3292, 2854, 1773, 1272, 1126, 1080, 729 cm⁻¹; **MS-ESI** (negativo), *m/z*; calculado para C₁₃H₇O₄, [M-H]⁻: 227.0; encontrado: 226.7.

Los sucedáneos no fluorescentes de la **Serie 2** se preparan siguiendo un procedimiento similar al descrito en la bibliografía mediante condensación del correspondiente fenol y ácido benzoico en presencia de anhídrido trifluoroacético (S. Kumar, K. Muller, *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, 35, 405-411; b) S. Kumar, K. Muller, *Eur. J. Med. Chem.* **1999**, 34, 1035-1042)

Ejemplo 5

Síntesis de un polímero de impronta molecular usando **S1-AOH-a** como molécula plantilla.

La síntesis del polímero, se lleva a cabo tal y como se describe a continuación: la molécula plantilla **S1-AOH-a** (28 mg, 0,125 mmmol), el clorhidrato de 2-aminoetil metacrilamida comercial (EAMA) (670 mg, 4 mmol/mg), hidróxido de tetrabutilamonio comercial (1038 mg, 4 mmol), EDMA comercial (3,8 mL, 20 mmol) y el iniciador radicalico ABDV comercial (44 mg) se disuelven en dimetilsulfóxido (DMSO) (5,6 mL). Después de la disolución, la mezcla se traspasa a un tubo de vidrio sellado, se disminuye la temperatura a 0°C y se purga bajo una corriente de nitrógeno durante 10 min. Después del proceso de purga, se sella el tubo de vidrio y se inicia la polimerización térmicamente en un una estufa a 60°C. El procedimiento de polimerización dura 48 h. Tras este proceso, el tubo se rompe y el polímero obtenido en forma de monolito se lava secuencialmente para eliminar minuciosamente la molécula molde según los siguientes pasos: metanol (100 mL), metanol/ácido trifluoroacético (99:1 v/v) y finalmente metanol (100 mL).

El polímero se tritura y tamiza hasta conseguir unas partículas de tamaño comprendido entre 25 y 50 μm , libres de partículas finas, y éstas son utilizadas en el procedimiento de extracción en fase sólida. Un polímero control (denominado frecuentemente "NIP", del término inglés "*non-imprinted polymer*") se prepara siguiendo el mismo procedimiento, pero en ausencia de la molécula molde.

Ejemplo 6

10 Síntesis de un polímero de impronta molecular usando **S1-AME-a** como molécula plantilla.

La síntesis del polímero, se lleva a cabo tal y como se describe a continuación: la molécula plantilla **S1-AME-a** (33 mg, 0,125 mmol), el
15 clorhidrato de 2-aminoetil metacrilamida (EAMA) comercial (670 mg, 4 mmol), hidróxido de tetrabutilamonio comercial (1038 mg, 4 mmol), EDMA comercial (3,8 mL, 20 mmol) y el iniciador radicalico ABDV comercial (44 mg) se disuelven en dimetilsulfóxido (DMSO) (5,6 mL). Después de la disolución, la
20 mezcla se traspasa a un tubo de vidrio sellado a 0°C y se purga bajo una corriente de nitrógeno durante 10 min. Después del proceso de purga, se sella el tubo de vidrio y la se inicia la polimerización térmicamente en un una estufa a 60°C. El procedimiento de polimerización dura 48 h. Tras este proceso el tubo se rompe y el polímero obtenido en forma de monolito se lava secuencialmente para eliminar la molécula molde según los siguientes pasos:
25 metanol (100 mL), metanol/ácido trifluoroacético (99:1 v/v) y finalmente metanol (100 mL). El polímero se tritura y tamiza hasta conseguir unas partículas de tamaño comprendido entre 25-50 μm , libres de partículas finas, y éstas son utilizadas en procedimiento de extracción en fase sólida. Un polímero control (NIP) se prepara siguiendo el mismo procedimiento pero en
30 ausencia de la molécula molde.

Ejemplo 7

Uso de polímeros de impronta molecular para la determinación de alternariol en zumos.

5

Uno de los usos de la presente invención se ilustra mediante este ejemplo siendo no limitativo su alcance. Su uso como sorbentes o fases estacionarias en la extracción en fase sólida de los analitos diana es una de las aplicaciones más características de los polímeros de impronta molecular. En el presente ejemplo se utiliza el polímero descrito en el ejemplo 5 y se empaquetan 25 mg de polímero de impronta molecular (partículas de 25-50 μm) en cartuchos de extracción en fase sólida de 1 mL. Tras un acondicionamiento con metanol (10 mL), y utilizando 10 mL de una disolución acuosa tamponada de ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico comercial de concentración 0,1 M y pH 7.5), se cargan los cartuchos con 10 mL de la muestra objeto de análisis previamente preparada de la siguiente manera:

Se toman 80 mL de zumo de manzana previamente contaminados con un nivel de concentración de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$, se mezclan con 20 mL de acetonitrilo y se filtran a través de un filtro de nylon de $0,45 \mu\text{m}$ de diámetro de poro (el cual se ha comprobado previamente que es inerte a la retención de alternariol). A continuación, se disuelven en ellos 2,5 g de ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico y se ajusta el pH hasta obtener un valor de 7,5.

25

Una vez percolada la muestra sobre los cartuchos, se procede al lavado de los mismos pasando a través de ellos 1 mL de una mezcla acetonitrilo/agua 30:70 v/v, para eluir todos aquellos compuestos que se hayan quedado retenidos en el polímero de una forma no selectiva. Finalmente se realiza la elución selectiva del alternariol percolando 1 mL de una mezcla de metanol/ácido trifluoroacético 95:5 (v/v).

30

Este extracto se analiza utilizando un cromatógrafo de líquidos (HPLC) HP-1100 de Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) equipado con una bomba cuaternaria, un desgasificador en flujo, automuestreador, inyector automático y un termostatzador para columna. La detección se realiza con un detector
5 de fluorescencia. La separación del alternariol se lleva a cabo mediante una columna de HPLC AQUA™ C18 (recubrimiento polar) (250 × 4.6 mm, 5 μm) protegida con una precolumna RP18 (4.0 × 3.0 mm, 5 μm), ambos de Phenomenex (Torrance, CA). Las condiciones cromatográficas son las siguientes: volumen de inyección 8 μL, caudal 1 mL min⁻¹, fase móvil 65:35
10 (v/v) metanol/agua y se usaron las longitudes de onda $\lambda_{exc} = 258$ nm y $\lambda_{em} = 440$ nm para llevar a cabo la detección.

Como puede apreciarse en la figura 5, la funcionalidad y la aplicabilidad del MIP es excelente, tanto para la preconcentración de alternariol, como para el
15 proceso de limpieza de la muestra de zumo de manzana.

Reivindicaciones

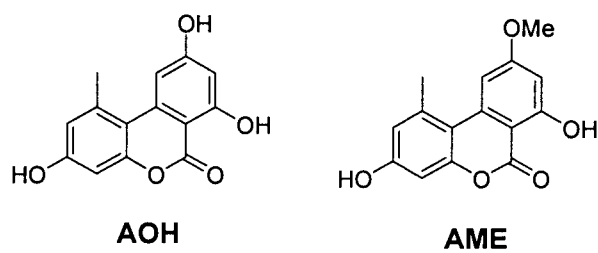
1. Polímeros de impronta molecular para el reconocimiento selectivo de micotoxinas de *Alternaria* preparados en presencia de una plantilla molecular donde dicha plantilla es una molécula de estructura análoga a la micotoxina de *Alternaria*.
2. Polímeros de impronta molecular para el reconocimiento selectivo de micotoxinas de *Atlernaria* preparados en presencia de una plantilla molecular, según la reivindicación 1, donde la micotoxina de *Alternaria* es alternariol (AOH) y/o alternariol monometil éter (AME).
3. Polímeros de impronta molecular para el reconocimiento selectivo de micotoxinas de *Atlernaria* preparados en presencia de una plantilla molecular, según reivindicaciones 1 y 2, donde la molécula plantilla se selecciona del grupo:
 - 3-hidroxi-8,9-dimetoxi-6*H*-benzo[c]cromen-6-ona (S1-AMEa)
 - 3-hidroxi-8-metoxi-6*H*-benzo[c]cromen-6-ona (S1-AMEb)
 - 3-hidroxi-8,9-dimetoxi-1-metil-6*H*-benzo[c]cromen-6-ona (S1-AMEc)
 - 3-hidroxi-8-metoxi-1-metil-6*H*-benzo[c]cromen-6-ona (S1-AMEd)
 - 3,8,9-trihidroxi-6*H*-dibenzo[b,d]piran-6-ona (S1-AOHa)
 - 3,9-dihidroxi-6*H*-dibenzo[b,d]piran-6-ona (S1-AOHb)
 - 3,8,9-trihidroxi-1-metil-6*H*-benzo[c]cromen-6-ona (S1-AOHc)
 - 3,8-dihidroxi-1-metil-6*H*-benzo[c]cromen-6-ona (S1-AOHd)
 - 2,3,4-trimetoxibenzoato de 3-metoxifenilo (S2-AMEa)
 - 2,3,4-trimetoxibenzoato de 3-metoxi-5-metilfenilo (S2-AMEb)
 - benzoato de 3-metoxifenilo (S2-AMEc)
 - benzoato de 3-metoxi-5-metilfenilo (S2-AMEd)
 - 2,3,4-trihidroxibenzoato de 3-hidroxifenilo (S2-AOHa)
 - 2,3,4-trihidroxibenzoato de 3-hidroxi-5-metilfenilo (S2-AOHb)
 - benzoato de 3-hidroxifenilo (S2-AOHc)
 - benzoato de 3-hidroxi-5-metilfenilo (S2-AOHd)

o cualquiera de sus sales resultantes del tratamiento de la molécula plantilla con uno o más equivalentes de base capaz de reaccionar con grupos hidroxilo fenólicos.

- 5 4. Polímeros de impronta molecular para el reconocimiento selectivo de micotoxinas de *Alternaria* preparados en presencia de una plantilla molecular, según reivindicación 3, donde la sal es una sal de amonio cuaternario.
- 10 5. Polímeros de impronta molecular para el reconocimiento selectivo de micotoxinas de *Alternaria* preparados en presencia de una plantilla molecular, según reivindicaciones anteriores, preparados con monómeros acrílicos sencillos, monómeros acrílicos di- o tri- funcionales entrecruzantes y/o monómeros acrílicos mono- o poli-funcionales
15 portadores de grupos funcionales químicos que muestren afinidad por las moléculas plantilla.
6. Polímeros de impronta molecular, según reivindicación 5, cuyo entrecruzante es etilenglicoldimetacrilato (EDMA).
- 20 7. Polímeros de impronta molecular, según las reivindicación 5 y 6, cuyo(s) monómero(s) funcional(es) contiene(n) uno o más grupos amino.
8. Polímeros de impronta molecular, según las reivindicaciones 5 y 6, cuyo(s)
25 monómero(s) funcional(es) contiene(n) uno o más grupos ácido carboxílico.
9. Polímeros de impronta molecular, según las reivindicaciones 5 y 6, cuyo(s)
30 monómero(s) funcional(es) contiene(n) uno o más grupos derivados 1,3-disustituidos de la urea.
10. Polímeros de impronta molecular, según las reivindicaciones anteriores,

preparados en forma de monolito o de bloque.

- 5 11. Polímeros de impronta molecular según las reivindicaciones 2-9 que se hayan obtenido a través de cualquier técnica de injerto, recubrimiento de partículas esféricas o nanopartículas.
- 10 12. Uso de los polímeros de impronta molecular reivindicados para la preconcentración de **AOH**, **AME** o cualquiera de sus derivados en cualquier matriz natural (e.g. carne, pescado, frutas, hortalizas, vegetales o aguas) o en cualquiera de sus derivados (e.g. zumos, vinos).
- 15 13. Uso de de los polímeros de impronta molecular reivindicados para la limpieza de una muestra de **AOH**, **AME** o cualquiera de sus derivados en cualquier matriz natural (e.g. carne, pescado, frutas, hortalizas, vegetales o aguas) o en cualquiera de sus derivados (e.g. zumos, vinos).
14. Uso de de los polímeros de impronta molecular reivindicados como sensor.
- 20 15. Uso de de los polímeros de impronta molecular reivindicados como elemento de captura o material de detección en cualquier tipo de ensayo.

**Figura 1**

2/5

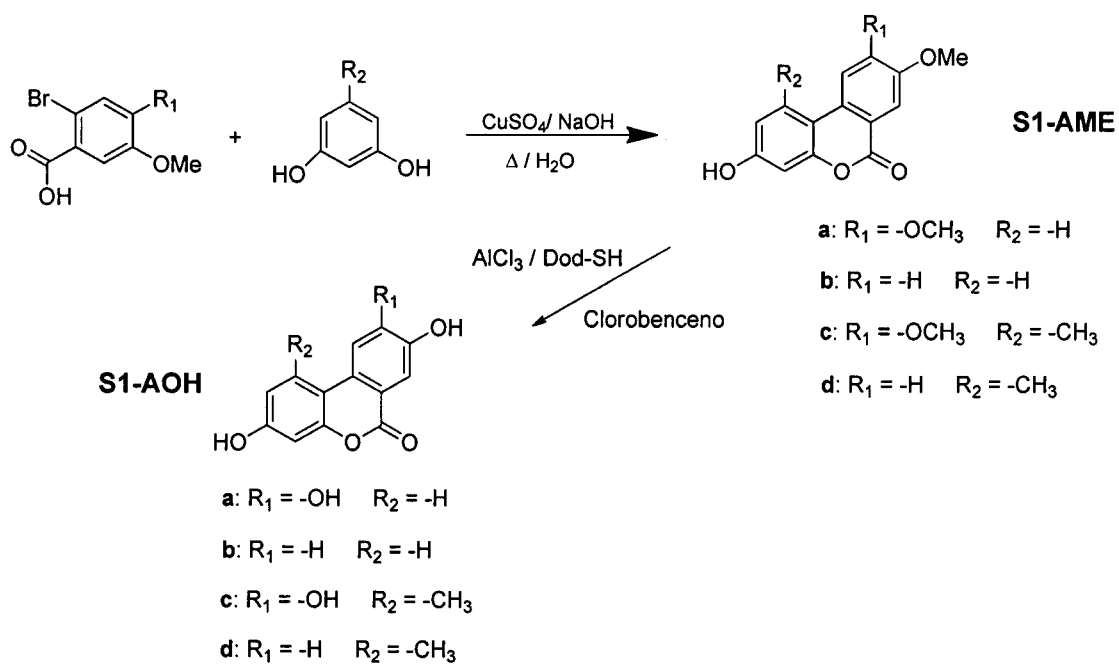


Figura 2

3/5

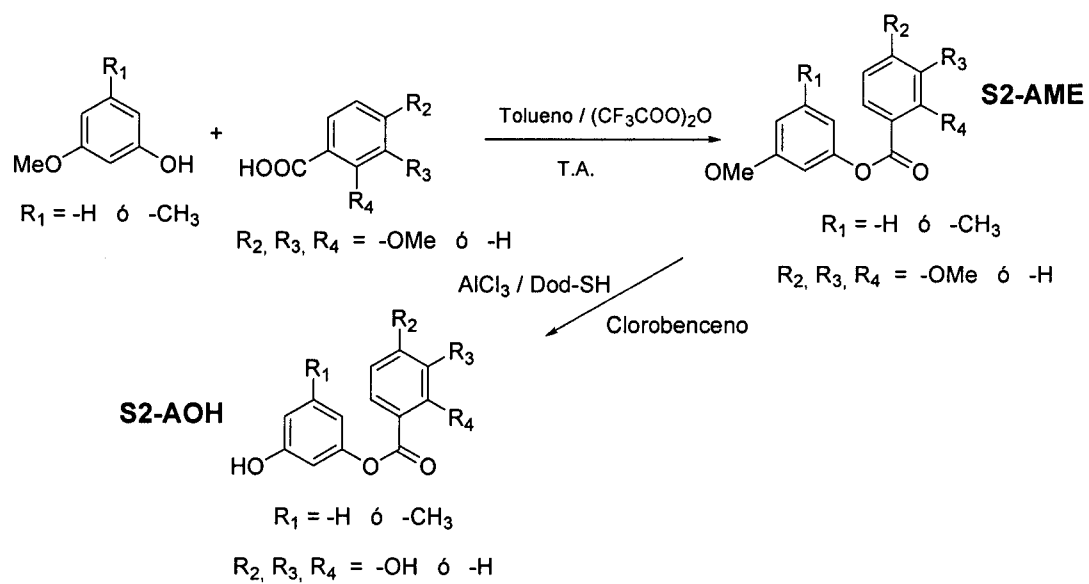


Figura 3

4/5

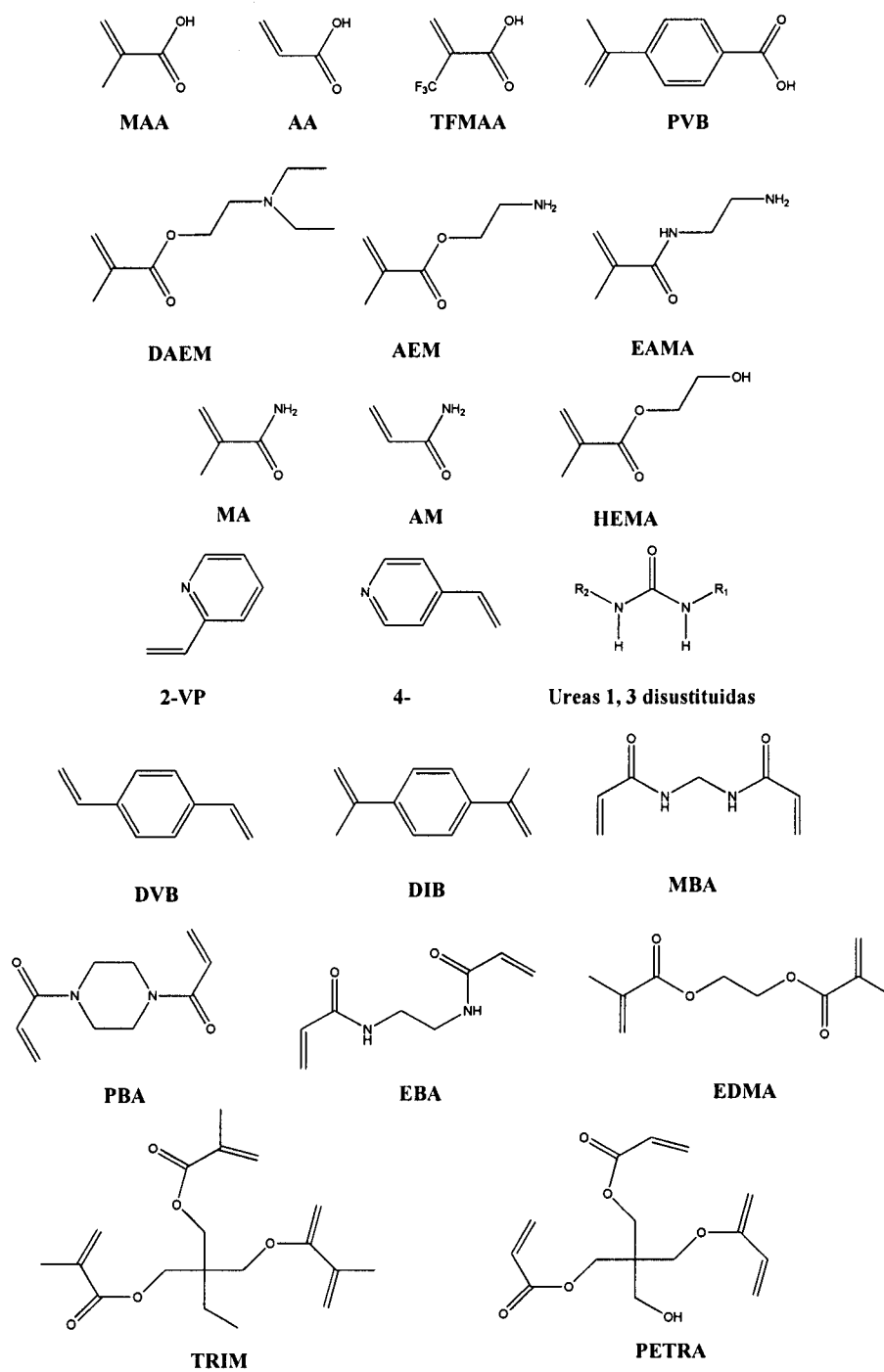


Figura 4

5/5

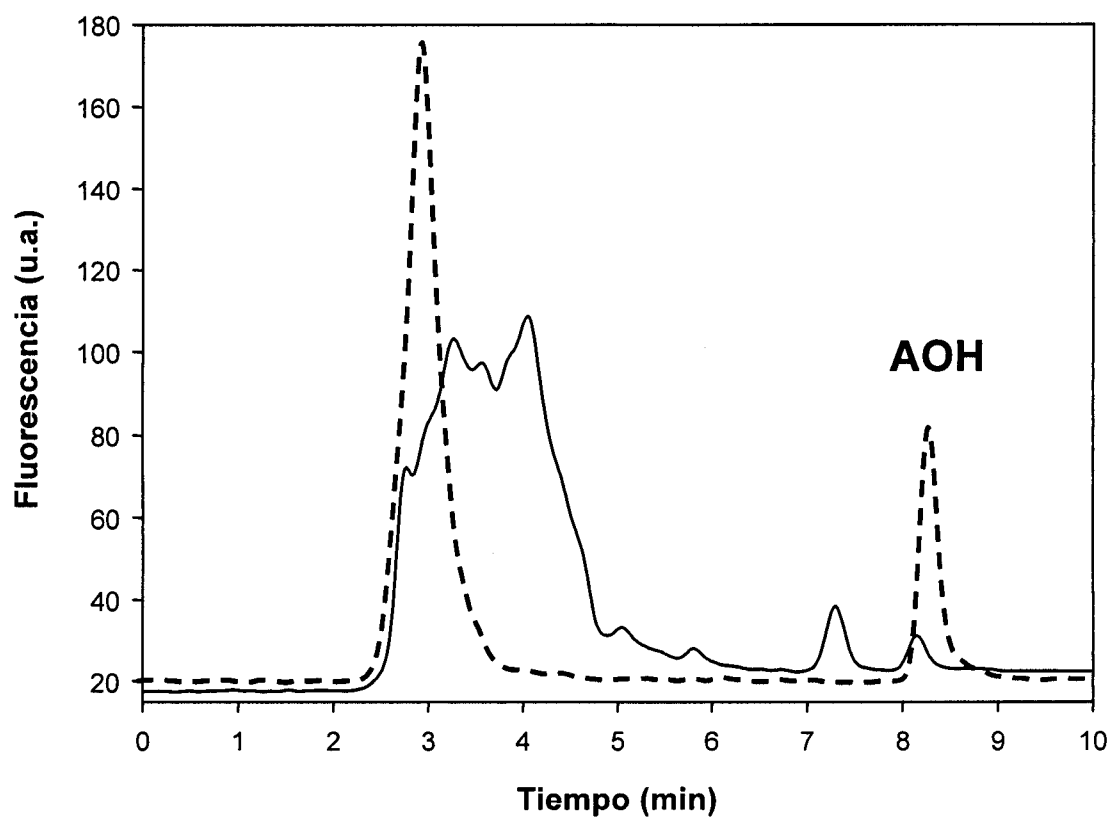


Figura 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2013/000082

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)

C08F, A23L, B01J, C07C, C07D

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, ESPACENET, CAS, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2011/031562 A1 (ALTECH INC) 17-03-2011, the whole document	1-15
A	WO 03/101580 A1 (AUSTRIA WIRTSCHAFTSSERVICE GESELLSCHAFT MIT BESCHRANKTER HAFTUNG) 11-12-2003, claim 1	1-15

☐ 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
12/11/2012

Date of mailing of the international search report
(31/05/2013)

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
M. Fernández Fernández

Telephone No. 91 3495489

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2013/000082

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2011031562 A1	17.03.2011	US2012214897 A1	23.08.2012
		US8426541 B2	23.04.2013
		CO6440520 A2	15.05.2012
		MA33597 B1	01.09.2012
		MX2012002494 A	26.03.2012
		US2011054132 A1	03.03.2011
		US8153737 B2	10.04.2012
		PE08622012 A1	23.07.2012
		KR20120041763 A	02.05.2012
		JP2013503251 A	31.01.2013
		EP2470894 A1	04.07.2012
		EP2470894 A4	13.02.2013
		EA201290061 A1	30.11.2012
		CN102549424 A	04.07.2012
		CA2770343 A1	17.03.2011
		AU2010292495 A1	08.03.2012
-----	-----	-----	-----
WO03101580 A1	11.12.2003	EP1509302 A1	02.03.2005
		AU2003242600 A1	19.12.2003
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2013/000082

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C08F222/10 (2006.01)

A23L1/015 (2006.01)

B01J20/26 (2006.01)

C07C69/78 (2006.01)

C07D309/30 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/ES2013/000082

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)
C08F, A23L, B01J, C07C, C07D

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, ESPACENET, CAS, FSTA

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	WO 2011/031562 A1 (ALTECH INC) 17-03-2011, todo el documento	1-15
A	WO 03/101580 A1 (AUSTRIA WIRTSCHAFTSSERVICE GESELLSCHAFT MIT BESCHRANKTER HAFTUNG) 11-12-2003, reivindicación 1	1-15

☐ 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.
12/11/2012

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
31- MAYO- 2013 (31/05/2013)

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
M. Fernández Fernández
Nº de teléfono 91 3495489

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2013/000082

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO2011031562 A1	17.03.2011	US2012214897 A1 US8426541 B2 CO6440520 A2 MA33597 B1 MX2012002494 A US2011054132 A1 US8153737 B2 PE08622012 A1 KR20120041763 A JP2013503251 A EP2470894 A1 EP2470894 A4 EA201290061 A1 CN102549424 A CA2770343 A1 AU2010292495 A1	23.08.2012 23.04.2013 15.05.2012 01.09.2012 26.03.2012 03.03.2011 10.04.2012 23.07.2012 02.05.2012 31.01.2013 04.07.2012 13.02.2013 30.11.2012 04.07.2012 17.03.2011 08.03.2012
----- WO03101580 A1 -----	----- 11.12.2003 -----	----- EP1509302 A1 AU2003242600 A1 -----	----- 02.03.2005 19.12.2003 -----

CLASIFICACIONES DE INVENCION

C08F222/10 (2006.01)

A23L1/015 (2006.01)

B01J20/26 (2006.01)

C07C69/78 (2006.01)

C07D309/30 (2006.01)