

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 576 077**

21 Número de solicitud: 201630258

51 Int. Cl.:

**A61K 47/40** (2006.01)

**A61K 31/085** (2006.01)

**A61P 23/00** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**04.03.2016**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**05.07.2016**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA  
(100.0%)  
Plaza Cronista Isidoro Valverde, s/n Ed. La  
Milagrosa  
30202 Cartagena (Murcia) ES**

72 Inventor/es:

**GARCÍA AYALA, Alfonso;  
LÓPEZ CÁNOVAS, Amanda Esperanza;  
LÓPEZ GÓMEZ, Antonio;  
MULERO MÉNDEZ, Victoriano Francisco y  
ROS CHUMILLAS, María**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

54 Título: **Solución anestésica y su método de aplicación para el anestesiado, aturdido y sacrificio de peces**

57 Resumen:

Solución anestésica y su método de aplicación para el anestesiado, aturdido y sacrificio de peces. Esta invención se refiere a una solución anestésica que comprende un agente anestésico natural (aceite esencial de clavo, isoeugenol y/o eugenol), nanoencapsulado en  $\beta$ -ciclodextrinas, formando un complejo de inclusión, donde la proporción del anestésico natural en el complejo de inclusión está comprendida entre el 5 y el 30% y la proporción de las  $\beta$ -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. 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.

ES 2 576 077 A1

## DESCRIPCIÓN

Solución anestésica y su método de aplicación para el anestesiado, aturrido y sacrificio de peces.

5

### **Campo de la invención**

La presente invención pertenece al campo de la tecnología de anestesiado en animales, en particular se refiere al aturrido 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  $\beta$ -ciclodextrinas, formulados con hielo o agua. Asimismo se refiere a un método de anestesiado, aturrido y/o sacrificio de peces de acuicultura y experimentación basado en el empleo de dicha solución anestésica.

15

### **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 aturrido 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.

20

25

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

30

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-feniletíl) 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, chlorobutanol, 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).*

5 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  
10 queden inmediatamente inconscientes e insensibles al dolor. Esto se puede interpretar como que son deseables aquellas técnicas que consigan anestésiar (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  
15 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  
20 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 aturrido y el sacrificio, lo que se traduce en un aumento significativo de los niveles de glucosa en  
25 sangre.

Además, de la filosofía de la producción ecológica de alimentos en general (también  
30 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 aturrido y sacrificio. Por tanto, un anestésiante deseable en acuicultura orgánica o ecológica sería el aceite esencial de clavo (AEC). Pero el uso de este anestésiante 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., Tsopekos 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.

10 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  $\beta$ -ciclodextrinas ( $\beta$ -CD) sí está estudiado, pero nunca se ha ensayado su efecto o su interés en el anestésico o sacrificio de peces.

15

Sin embargo, sí que se ha propuesto el uso de agentes anestésicos para humanos en combinación con  $\beta$ -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 esteroideos 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  $\beta$ -ciclodextrinas para su uso en el anestésico de peces.

20

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.

30

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  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -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  $\beta$ - and HP- $\beta$ -CDs. Food and Nutrition Sciences, 3:716-723*), estudia la asociación molecular entre  $\beta$ -CD y eugenol y aceite esencial de clavo, aunque no estudia 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  $\beta$ -ciclodextrinas. 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.

## 5 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<sub>3</sub> 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 pCO<sub>2</sub> en sangre de dorada (mmHg) en función del tipo de aturdimiento 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 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); **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).

30

## 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 anesthesiado, 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.

- 5 En una realización principal de la invención se contempla una solución anestésiante (de aquí en adelante solución de la invención) que comprende un agente anestésiante natural nanoencapsulado en  $\beta$ -ciclodextrinas, formando un complejo de inclusión. La proporción del anestésiante 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  $\beta$ -  
10 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 anestésiante 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 anestésiante por kg de agua inicial).  
15

20 El agente anestésiante 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.

- 25 Las  $\beta$ -ciclodextrinas utilizadas para la formulación anestésiante 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), y un contenido de otras ciclodextrinas no superior al 2% (en base anhidra).  
30 Su solución en agua debe ser incolora.

La nanoencapsulación del aceite esencial en las  $\beta$ -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*).

- 5 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.

10 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.

15 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 aturdimiento o pérdida de consciencia del animal se puede conseguir en cuestión de segundos, y el sacrificio se lleva a cabo con menos sufrimiento animal.

20 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:

- 25
- 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,
- 30
- 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.

5

- 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:

10

- 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,

15

- 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,

20

- 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 aturcidos o anestesiados, como son pérdida de equilibrio, actividad natatoria nula, y falta de respuesta a estímulos externos, y

25

- 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.

30

5 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 aturrido o anestesiado y se consigue, por tanto, reducir así el sufrimiento animal durante el aturrido y sacrificio de los peces de acuicultura o experimentación.

### **Ejemplos**

#### *Material y metodología seguida*

10

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

15

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

20

- 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
- 25 incluido en  $\beta$ -CD, y a una temperatura de -0.5 °C.

30

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

30

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  $\beta$ -CD, se llevó a cabo mediante el método del amasado (tal como describe con detalle *Marques, 2010*).

5 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  
10 realizó un análisis utilizando cartuchos desechables CG4 y un analizador de sangre i-STAT, midiendo lactato,  $pCO_2$  (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  
15 llevaron a cabo de acuerdo con la aprobación de la Comisión de Ética de la Universidad de Murcia.

### *Resultados obtenidos*

20 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+ $\beta$ -CD (**Figura 1 A**). Se obtienen unos valores de lactato superiores en aquellos individuos aturdidos 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  
25 distintas concentraciones de AEC+ $\beta$ -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+ $\beta$ -CD). También se apreciaron diferencias significativas entre los individuos aturdidos a distintas concentraciones de AEC+ $\beta$ -CD en hielo líquido a -5 °C (**Figura 1 B**). Así, se encontraron valores superiores de lactato en individuos que habían sido aturdidos con hielo picado y agua de mar (1:1) sin agente anestésico. Así, se  
30 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 aturdidos 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.

5 En lo que se refiere a los valores de pCO<sub>2</sub> 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**).

10

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 anestésico 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<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub> 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 aturdido de 10-15 s (en hielo líquido con AEC+  $\beta$ -CD), o de menos de 55 segundos (en agua de mar con hielo picado, con AEC+ $\beta$ -CD), frente a tiempos de más de 4 minutos obtenidos con agua de mar y hielo picado (1:1) sin AEC+ $\beta$ -CD (que constituye el método tradicional de aturdido 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 aturdido 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 aturdidos y sacrificados con el método tradicional de aturdido 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 aturdido 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 aturdido 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.

**REIVINDICACIONES**

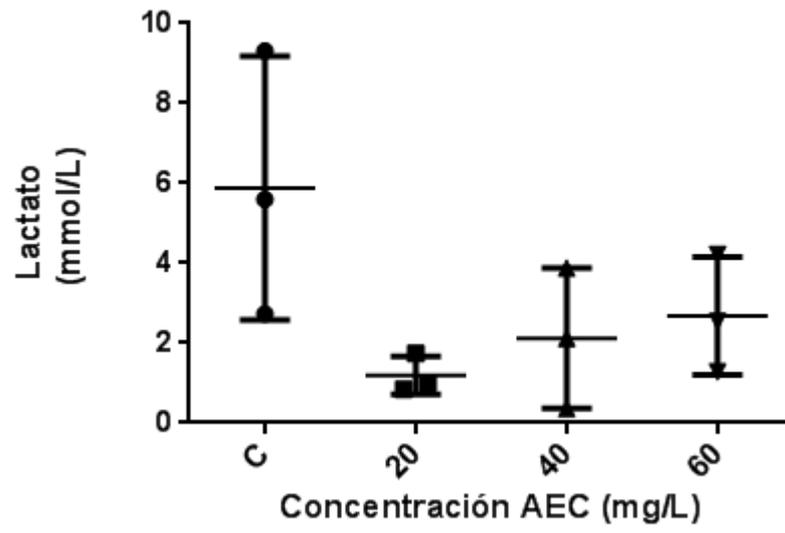
1. Solución anestésiante que comprende:
- un agente anestésiante natural, seleccionado de entre aceite esencial de clavo, isoeugenol y/o eugenol,
  - $\beta$ -ciclodextrinas, formando un complejo de inclusión con el agente anestésiante natural, y
  - agua, seleccionada de entre agua dulce, agua de mar, hielo líquido o agua con hielo picado,
- caracterizada porque la proporción del anestésiante natural en el complejo de inclusión está comprendida entre el 5 y el 30% de la masa total del complejo, y la proporción de las  $\beta$ -ciclodextrinas en el complejo de inclusión está comprendida entre el 70 y el 95% de la masa total del complejo, y porque el agente anestésiante se encuentra en una concentración comprendida entre 5 y 60 mg de agente anestésiante/kg de agua.
2. Solución anestésiante, según la reivindicación 1, donde la proporción del agente anestésiante en el complejo de inclusión está comprendida entre el 10 y el 20% y la proporción de las  $\beta$ -ciclodextrinas entre el 80 y el 90%.
3. Solución anestésiante, según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde el agente anestésiante está en una concentración comprendida entre 10 y 40 mg de agente anestésiante/kg de agua.
4. Solución anestésiante, 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 anestésiante, 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 anestésiante, según las reivindicaciones 1-5, para el sacrificio

de peces.

7. Método para el sacrificio de peces que comprende los siguientes pasos:

- 5
- i) Preparar una solución anestésica de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, formulada en hielo líquido, a una temperatura comprendida entre  $-8^{\circ}\text{C}$  y  $0^{\circ}\text{C}$ , o en agua con hielo picado, a una temperatura comprendida entre  $-1^{\circ}\text{C}$  y  $0^{\circ}\text{C}$ ,
- ii) Sumergir en la solución preparada en i), como máximo, tantos kilogramos de peces como kilogramos de solución,
- 10
- 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 aturdidos de la solución,
- v) Introducir los peces aturdidos en agua con hielo, en una proporción agua:hielo en peso comprendida entre 1:1 y 1:3, y a una temperatura comprendida entre
- 15
- $-1^{\circ}\text{C}$  y  $0^{\circ}\text{C}$ , en una proporción, como máximo, de tantos kilogramos de peces como kilogramos de agua con hielo, hasta el sacrificio de los mismos.

A)



B)

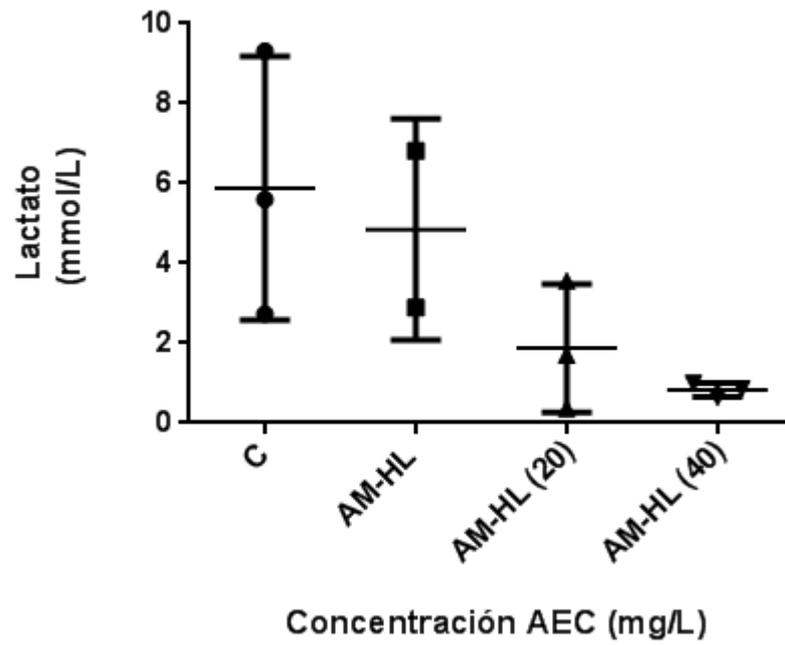


FIGURA 1

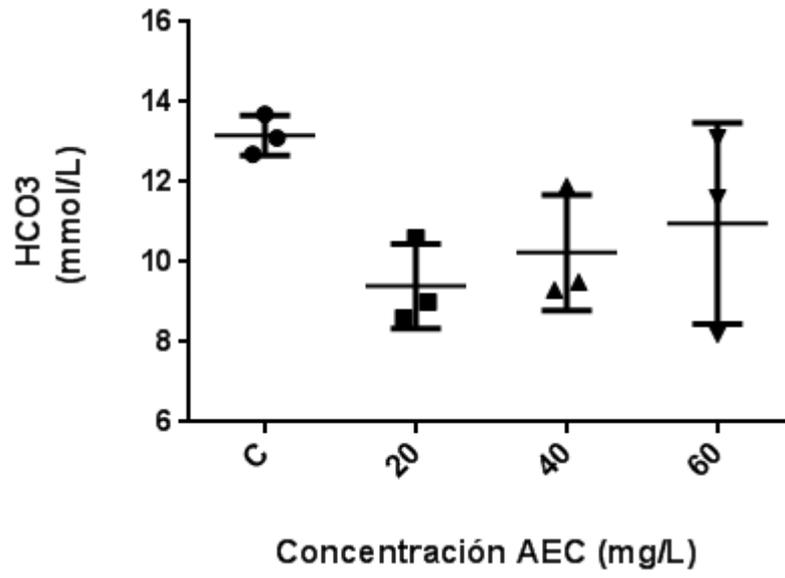


FIGURA 2

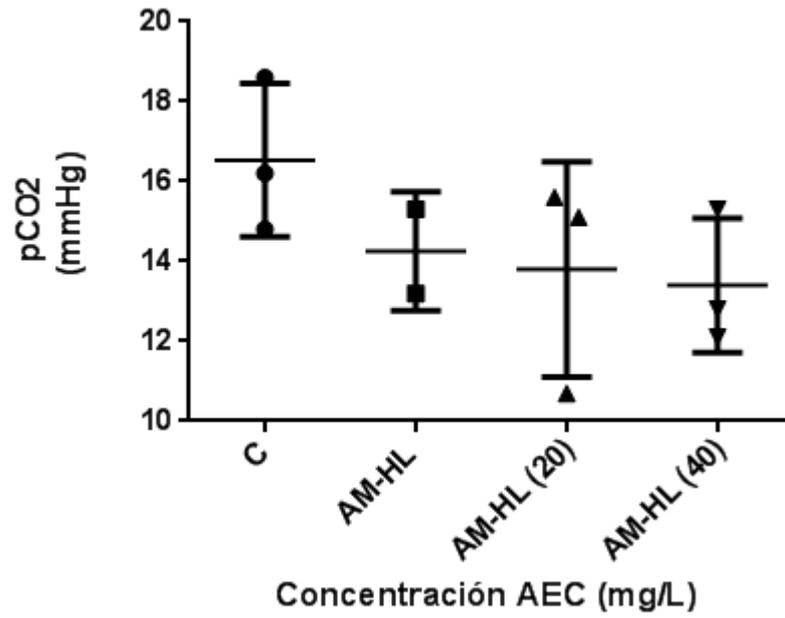
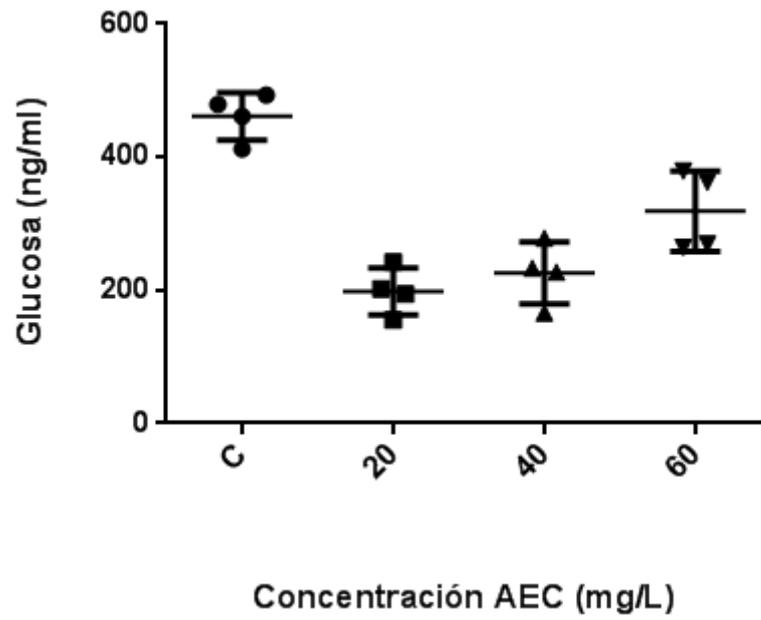


FIGURA 3

A)



B)

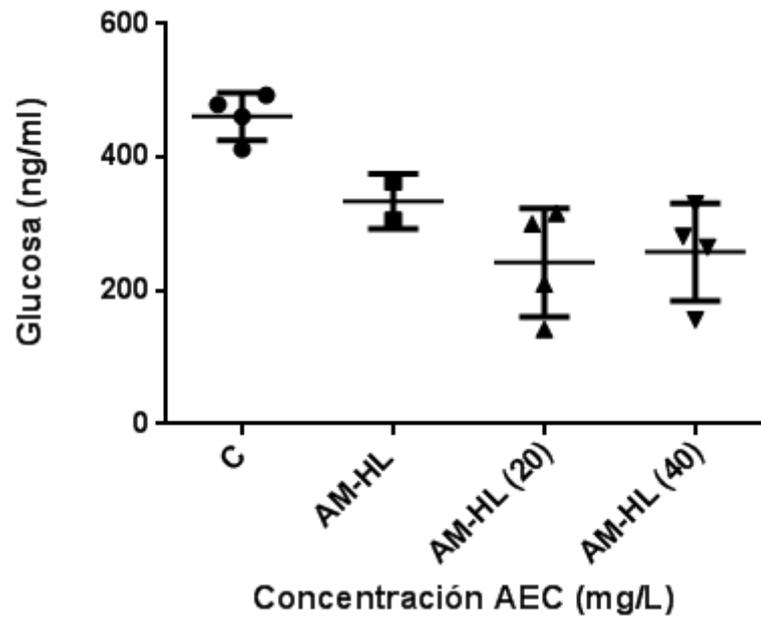


FIGURA 4



- ②<sup>1</sup> N.º solicitud: 201630258  
 ②<sup>2</sup> Fecha de presentación de la solicitud: 04.03.2016  
 ③<sup>2</sup> Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤<sup>1</sup> Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ <sup>6</sup> Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
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, 3, 716-723. Resumen y página 717, punto 2.2.1 Food and Nutrition Sciences.	1-7
A	AVMA Guidelines for Euthanasia of Animals: 2013 Edition. Página 70, punto 4; página 71, puntos 6 y s6.2.3.	6,7

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia  
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría  
 A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita  
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud  
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

<p><b>Fecha de realización del informe</b> 27.06.2016</p>	<p><b>Examinador</b> J. López Nieto</p>	<p><b>Página</b> 1/4</p>
---	---	------------------------------

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A61K47/40** (2006.01)

**A61K31/085** (2006.01)

**A61P23/00** (2006.01)

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

A61K, A61P

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

INVENES, EPODOC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.06.2016

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-7	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-7	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	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, 3, 716-723. Resumen y página 717, punto 2.2.1 Food and Nutrition Sciences.	
D02	AVMA Guidelines for Euthanasia of Animals: 2013 Edition. Página 70, punto 4; página 71, puntos 6 y s6.2.3.	

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

El documento D01 da a conocer una solución que comprende:

- Un agente anestésico natural: eugenol o aceite de clavo,
- $\beta$ -ciclodextrinas, formando un complejo de inclusión con el agente anestésico natural, y
- Agua.

(Resumen y página 717, punto 2.2.1)

El documento D02 divulga diferentes formas de anestésico o sacrificar peces conocidas en el estado de la técnica, entre ellas se encuentra la inmersión en una solución de eugenol, isoeugenol o aceite de clavo. La concentración de la solución variará según el tamaño de los peces y el tiempo de tratamiento lo hará en función de que el resultado final deseado sea anestesia o sacrificio. Otros métodos de anestesia o sacrificio son producir choque hipotérmico por enfriamiento o la congelación. Se indica que los métodos de sacrificio tales como la congelación solo podrán aplicarse si los peces han sido previamente anestesiados (página 70 punto 4; página 71 puntos 6 y s6.2.3)

En lo que se refiere a la reivindicación 1, ninguno de los documento del estado de la técnica tomados en consideración divulga una solución anestésico que comprenda un agente anestésico natural: eugenol o aceite de clavo;  $\beta$ -ciclodextrinas, formando un complejo de inclusión con el agente anestésico natural y agua caracterizada porque la proporción anestésico natural en el complejo de inclusión esté comprendido entre el 5% y el 30% de la masa total del complejo y la proporción de  $\beta$ -ciclodextrinas en el complejo de extrusión está comprendida entre el 70% y el 95% de la masa total del complejo y porque el agente anestésico se encuentra en una concentración comprendida entre 5 y 60mg de agente anestésico por Kg de agua.

Por lo tanto, las reivindicaciones 1-7 cumplen el requisito de novedad según el art. 6.1 de la Ley de Patentes 11/86.

Sin embargo, las reivindicaciones 1-7 no cumplen el requisito de actividad inventiva según el art. 8.1 de la Ley de Patentes 11/86 por los siguientes motivos:

La solución de la reivindicación 1 se diferencia de la solución divulgada en el documento D01 en que está caracterizada por márgenes de concentración para el agente anestésico (entre el 5% y el 30%) y las  $\beta$ -ciclodextrinas (70% y el 95%) en la masa total del complejo, así como por que el agente anestésico se encuentra en una concentración comprendida entre 5 y 60mg de agente anestésico por Kg de agua.

A la vista de lo que se conoce por el documento D01, no se considera que requiera un esfuerzo inventivo para un experto en la materia variar y ajustar las concentraciones del agente anestésico y las  $\beta$ -ciclodextrinas en el complejo de inclusión para obtener la solución contenida en la reivindicación 1.

Las características técnicas divulgadas en las reivindicaciones dependientes 2-5 se consideran meras ejecuciones particulares obvias para un experto en la materia.

Por otra parte, el uso de soluciones de eugenol, isoeugenol o aceite de clavo para el sacrificio de peces es de conocimiento general en el estado de la técnica (D02) La solución usada en la invención para sacrificar peces, según la reivindicación 6, se diferencia del estado de la técnica conocido en que el agente anestésico está formando un complejo con  $\beta$ -ciclodextrinas con lo cual se aumenta su solubilidad en agua (D01, resumen) Puesto que no se aprecia ningún efecto técnico inesperado o sorprendente por el hecho de utilizar estos complejos para el sacrificio de peces, con respecto al estado de la técnica conocido, se considera que la reivindicación 6 no tiene actividad inventiva.

En cuanto a la reivindicación 7, el uso de soluciones de eugenol, isoeugenol o aceite de clavo para anestésico peces y la inmersión de estos en agua con hielo para su sacrificio son procedimientos de conocimiento general en el estado de la técnica, así como la posibilidad de utilizar un método de sacrificio por congelación en el que los peces han sido previamente anestesiados (D02)

Para un experto en la materia sería una posibilidad obvia la preparación y utilización de soluciones como las divulgadas en D01 para anestésico peces mediante inmersión y posteriormente introducirlos en agua con hielo para sacrificarlos, ajustando las condiciones operativas (temperatura, tiempo, etc.) con el fin de desarrollar el método de la reivindicación 7, lo cual no supone actividad inventiva.