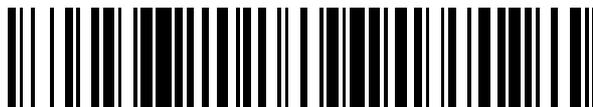


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 540 501**

21 Número de solicitud: 201331155

51 Int. Cl.:

A23K 1/18 (2006.01)

A01N 31/08 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

26.07.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

09.07.2015

Fecha de la concesión:

29.04.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

09.05.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (100.0%)
Ctt. Otri Casa del Estudiante C/Real de Burgos
s/nº
47001 VALLADOLID (Valladolid) ES**

72 Inventor/es:

**BERNAL YAGÜE, José Luis;
DEL NOZAL NALDA, María Jesús;
TORIBIO RECIO, Laura;
BERNAL DEL NOZAL, José;
MARTÍN GÓMEZ, María Teresa;
HIGES PASCUAL, Mariano y
MARTÍN HERNÁNDEZ, Raquel**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

54 Título: **Composición alimenticia de abejas melíferas y procedimiento para controlar infecciones en dichas abejas mediante dicho alimento**

57 Resumen:

Composición alimenticia de abejas melíferas y procedimiento para controlar infecciones en dichas abejas mediante dicho alimento.

La presente invención se refiere a una composición alimenticia azucarada de abejas melíferas que contiene en su formulación al menos una fitoalexina de calidad alimentaria, preferentemente transveratrol, en una cantidad comprendida entre 0.1% y 2.8% en peso del total de composición, incluidos ambos límites. Dicha composición puede presentarse en forma de alimento líquido en solución azucarada (jarabe) o de alimento semisólido en forma de pasta azucarada con baja humedad -menor del 50%-(candy). Asimismo, la invención se dirige a un procedimiento de control de las infecciones de las colonias de abejas melíferas, especialmente por *Nosema apis* y *Nosema ceranae*, (*Nosemosis A y C*), que comprende introducir en las colmenas la composición alimenticia, en al menos una dosis. El procedimiento permite el tratamiento de la colmena mediante aplicaciones programadas de los alimentos asegurando niveles efectivos durante al menos cinco semanas, todo ello sin producir efectos de rechazo en la colonia de abejas.

ES 2 540 501 B1

DESCRIPCIÓN

COMPOSICIÓN ALIMENTICIA DE ABEJAS MELÍFERAS Y PROCEDIMIENTO PARA CONTROLAR INFECCIONES EN DICHAS ABEJAS MEDIANTE DICHO ALIMENTO

5

Campo técnico de la invención

La invención se enmarca en el sector técnico de la Agricultura, más concretamente en el área de la Apicultura (crianza de abejas) y la Veterinaria (tratamiento de enfermedades en colmenas), aunque también está relacionada con el sector de la Alimentación y Consumo de productos provenientes de la cría de abejas.

10

Objeto de la invención

La presente invención se refiere a una composición alimenticia para las colonias de abejas melíferas que contiene fitoalexinas de calidad alimentaria, principalmente resveratrol (y especialmente trans-resveratrol), compuestos que son capaces de favorecer el desarrollo normal de las colonias, y en especial combatir las nosemosis (A y C). Asimismo, la invención está relacionada con un procedimiento para combatir las infecciones de las colonias de dichas abejas melíferas mediante la alimentación de las colonias de abejas con dicha composición alimenticia que contiene fitoalexinas.

20

Antecedentes de la invención

Las colonias de abejas melíferas son susceptibles a sufrir infecciones e infestaciones por agentes tales como virus, ácaros, lepidópteros, hongos, bacterias, etc., que afectan la salud de las abejas y en consecuencia disminuyen la productividad de las explotaciones apícolas y las acciones polinizadoras de estos insectos, originando colateralmente graves perjuicios económicos y medioambientales. Una de las principales infestaciones sufridas en la última década por las abejas a nivel mundial es atribuida a la acción del microsporidio *Nosema ceranae*, considerado como uno de los factores claves del reciente fenómeno de colapso masivo de colonias de abejas. Efectivamente, *Nosema ceranae* es actualmente el patógeno de las abejas más prevalente en España (Revisado por Higes M., Meana A., Bartolomé C., Botías C., Martín-Hernández R. *Nosema ceranae* (Microsporidia), a controversial 21st century honey bee pathogen. *Environmental Microbiology Reports* 2013, 5 (1), 17–29) superando incluso la prevalencia de la *Varroa destructor* (Garrido-Bailón, Tesis doctoral, 2012) lo que sugiere la importancia sanitaria que presenta. Además esta misma situación ha sido detectada en diferentes países europeos (Austria, Francia, Holanda, Suiza, Eslovenia,

35

Polonia, Italia, Grecia, Portugal, Alemania, etc.) y del continente Americano (Estados Unidos, Argentina, Chile, Uruguay). En todas estas zonas, se ha podido constatar científicamente el papel central de *Nosema ceranae* en el conocido como Síndrome de Despoblamiento de las Colmenas (SDC) o Desorden de Colapso de las Colonias (CCD) (Higes y col., 2008 Environmental Microbiology, Higes y col, 2009 Environmental Microbiology Reports), de ahí la necesidad de mejorar las estrategias de control. Estamos sin lugar a dudas ante el principal problema sanitario de la apicultura mundial en el siglo XXI. También los resultados de investigaciones realizadas por los inventores nos permiten descartar como factor prioritario los pesticidas agrícolas, fundamentalmente neonicotinoides, como responsables del problema generalizado de despoblamiento de las colmenas.

Como se ha indicado anteriormente, en los últimos años se ha producido una elevada mortandad de abejas en diferentes zonas apícolas tanto en España, como en países vecinos con características productivas similares (Faucon y col., 2002; Chauzat y col., 2004; Marinelli y col., 2004; Higes y co., 2005; Stokstad, 2007; Plischuck y col., 2009) o en otras zonas geográficas (Finley y col., 1996; Mangum 1999). En todos los casos se denunciaron elevadas mortalidades de colonias de abejas, sobre todo durante el otoño y el invierno, aunque durante 2005 también se detectaron a lo largo de todo el año.

Uno de los principales problemas que ha planteado este hallazgo es el hecho de que la fumagilina, el tratamiento disponible y de elección actual para la nosemosis causada por *N. apis* (Katznelson and Jamieson, 1952; Hartwig and Przelecka, 1971; Higes et al., 2004), si bien resulta efectiva tras su aplicación (Higes y col., 2008, 2009) actualmente no está autorizada en apicultura en la mayoría de los países de la Unión Europea, por lo que resulta fundamental desarrollar nuevas moléculas que suplan con éxito la ausencia de la fumagilina. Por lo tanto, la búsqueda de compuestos efectivos frente a *N. ceranae*, debe ser también un objetivo prioritario teniendo en cuenta la situación actual.

Por otra parte, y dado que muchos antifúngicos son de uso clínico limitado ya que frecuentemente conducen a varias toxicidades en pacientes, tales como efecto hemolítico frente a eritrocitos humanos, aparece otra opción orientada hacia el empleo de algunos productos naturales, que parecen no tener ese efecto drástico. Uno de los actualmente considerados es el resveratrol, que entre otras propiedades muestra un atractivo potencial como antifúngico en humanos, si bien todavía no se conoce el mecanismo real de su acción (Jung, 2005).

A este respecto, recientemente Maistrello y col. (2008) demostraron en pruebas realizadas únicamente en laboratorio y sin contrastar estos resultados con pruebas in situ que el resveratrol estándar analítico (no apto para consumo humano) adicionado a alimentos
5 aumentó la longevidad de las abejas y resultó eficaz para inhibir el desarrollo de *Nosema ceranae* en abejas infectadas. Sin embargo, no se han correlacionado aún estos datos con estudios de campo ni con alimentación convencional a colmenas. Esta sustancia ya ha sido también testada con éxito frente a otros microsporidios de humanos y mamíferos (Leiro y col., 2004; Jung y col., 2005; Didier y col., 2006).

10

El resveratrol se ha detectado como el principal componente bioactivo en extractos de plantas usadas desde siglos pasados en la medicina tradicional para enfermedades humanas, de hecho se ha mostrado tan potente como la anfotericina B frente a *S. cerevisiae*. Estudios recientes han mostrado que puede inhibir el desarrollo del microsporidio
15 *Encephalitozoon cunicoli* en experimentos in Vitro (Leiro, 2004).

20

Trans-resveratrol es una fitoalexina producida por las angiospermas en respuesta a las infecciones microbianas, daños, radiación UV, frío, calor, ataque de microorganismos, estrés abiótico, etc. La forma trans (t-r) del resveratrol aparece en la piel de uvas, cacahuetes,
20 pistachos, soja (Langcage, 1976; Dercks, 1989; Jeandet, 1993). El isómero cis (c-r) no se ha encontrado en *Vitis vinifera* aunque ambos suelen aparecer en los vinos. El resveratrol es un precursor de las viniferinas, que son potentes agentes antifúngicos (Palomino, 2000; Loredana, 2004). Ambos isómeros aparecen de forma natural como dos isómeros geométricos, generalmente el trans es más predominante (Filip, 2003) aunque también
25 aparecen sus glicósidos, piceidos, trans (t-p) y cis (c-p) que también poseen propiedades similares. In Vitro la forma trans es más termoestable y fotoestable y la cis más inestable, pasando rápidamente a la forma trans (Goldberg, 1995) aunque el trans también puede sufrir fotoisomerización, generando algo de cis (Hanzlikova, 2004), de modo que en experiencias prolongadas e intensas puede incrementar la cantidad de cis (Trela, 1996).

30

Descripción de la invención

35

Un primer objeto de la presente invención está constituido por una composición alimenticia azucarada para abejas melíferas que contiene en su formulación al menos una fitoalexina,
35 que es comúnmente y de manera más preferida resveratrol en su forma trans-, en una

cantidad comprendida entre 0.1% y 2.8% en peso del total de composición, incluidos ambos límites.

5 La fitoalexina es de grado farmacéutico. Se entiende por grado farmacéutico una fitoalexina apta para uso y consumo humano con calidad de suplemento alimentario (*food grade*), que debe cumplir las normas USFDA, EFSA ó AEMPS (*U.S. Food and Drug Administration, European Food Safety Authority* y Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, respectivamente), ya que dicho alimento dejará rastro en la miel producida por las abejas y no puede ser una fitoalexina, por ejemplo resveratrol industrial, como las que se
10 conocen en el mercado. En definitiva, no todas las fitoalexinas comercializadas, como el resveratrol, son de grado farmacéutico y aptas para consumo humano, por lo que la presente invención supone un avance en el campo al emplear fitoalexinas óptimas para alimentación de abejas de producción de miel, ceras y otros productos.

15 En una realización preferida, la fitoalexina es concretamente resveratrol, siendo más preferentemente todavía su forma trans- (uno de los isómeros del resveratrol). Preferentemente, del total de fitoalexinas que comprende el alimento el 99% es trans-resveratrol. De manera más preferida todavía, el 99,95% de la cantidad de fitoalexina que contiene la composición (0.1%-2.8% en peso del total de composición) es sólo de trans-
20 resveratrol.

Básicamente, la composición comprende una fitoalexina que es resveratrol en su forma trans- de forma mayoritaria, y al menos una segunda fitoalexina. Preferentemente, la segunda fitoalexina o fitoalexinas son seleccionadas entre cis-resveratrol, un isómero de
25 piceido y cualquier combinación de los mismos. Por isómero del resveratrol se entiende cualquiera de sus formas cis- y trans- (estando esta última siempre presente en esta realización); de igual forma, por isómero de piceido se entiende cualquiera de sus formas cis- y trans-. Esta alternativa es la más preferida, por cuanto las composiciones de fitoalexinas comerciales y de calidad alimentaria que se emplean para preparar la
30 composición alimenticia de abejas siempre presentan trazas de estas formas: cis-resveratrol e isómeros de piceido.

La composición alimenticia puede ser seleccionada entre un alimento líquido en solución azucarada y un alimento semisólido en forma de pasta azucarada con humedad inferior al
35 50%. En el primer caso, el líquido puede ser preferentemente un jarabe de alimentación de

abejas. En el segundo caso, puede ser preferentemente una pasta de azúcares o miel (- alimento fabricado a base de miel, también llamado “candy”, muy seco y duro que se reblandece por la absorción progresiva de la humedad de la colmena-). Por “azucarada se entiende que la composición alimenticia está principalmente constituida por azúcares, concretamente estando estos comprendidos de manera general entre 20%-85%, y más preferentemente entre 40% y 80%, en peso del total de composición.

Cuando la composición alimenticia es un jarabe de alimentación de abejas, éste puede contener preferentemente al menos una fitoalexina en una cantidad comprendida entre 0.4% y 2.8% en peso total de composición, incluido ambos límites. Así por ejemplo, puede contener entre 1 y 7 gramos de fitoalexinas cada 250 gramos de jarabe. Cuando la composición alimenticia es una pasta de azúcares o miel, ésta puede contener preferentemente entre 0.1% y 0.7% en peso total de composición, incluido ambos límites, de fitoalexinas. Así por ejemplo, puede contener entre 1 y 7 gramos de fitoalexina por cada 1000 g de pasta. En un caso u otro, la composición alimenticia comprende en su forma más preferida 0.6% en peso del total de composición de fitoalexinas.

En un caso particular más preferido de la invención cuando la composición alimenticia es un jarabe, en su forma más preferida contiene entre 1 y 2 gramos, más preferentemente entre 1.5 y 1.75 gramos (0.6%-0.7%), de fitoalexinas, cada 250 ml de jarabe de azúcar. Dicho jarabe puede ser jarabe de azúcar al 50% de agua.

En otro caso particular de la invención cuando la composición alimenticia es una pasta semisólida azucarada, en su forma más preferida contiene entre 5 y 7 gramos a, más preferentemente 6 gramos (0.6%), de fitoalexinas, por cada 1 kg de pasta semisólida azucarada, que puede comprender preferiblemente en su formulación:

- 30% de glucosa
- 50 % de fructosa
- 18% agua; y
- 2% de componentes adicionales.

De manera preferida, la composición alimenticia contiene también en cualquiera de sus formas vitaminas y/o aminoácidos que complementan el alimento.

La composición alimenticia descrita en cualquiera de sus variantes puede prepararse a partir de la combinación de un alimento azucarado para abejas, preferentemente en forma de composición líquida (por ejemplo jarabe, preparado comúnmente a partir de la mezcla de agua y azúcar en partes iguales en peso) o semisólida (por ejemplo candy, preparado comúnmente con miel y agua, aunque también puede prepararse con jarabe de glucosa y agua) con una composición de fitoalexinas de consumo humano, es decir de calidad alimentaria, según los criterios antes especificados. Esta composición de fitoalexinas puede estar compuesta exclusivamente por resveratrol, concretamente por trans-resveratrol que es la forma más común, o puede contener otras fitoalexinas como las mencionadas anteriormente, que es el caso más generalizado ya que suelen existir trazas de otras fitoalexinas conocidas.

Las composiciones alimenticias de colonias de abejas melíferas como las que se describen aquí, contribuyen de forma significativa al control de la infección, manteniendo los niveles de parasitación dentro de límites que permiten a las colonias ser productivas gracias a la presencia de las fitoalexinas, que se muestra como una alternativa eficaz, económica y ambientalmente más sostenible y sana para el consumidor que otros compuestos empleados en la actualidad, como la fumagilina (ver Ejemplos). Estas composiciones alimenticias se muestran especialmente eficaces frente a la nosemosis, y particularmente la nosemosis Tipo A y C. En el ámbito de la presente memoria se entiende por control de una infección a la reducción en la parasitación sin eliminar completamente la infección.

La presente invención se refiere también al uso de la composición alimenticia descrita, en cualquiera de sus variantes para el control de infecciones por microorganismos patógenos en colmenas de abejas melíferas, y especialmente de infecciones por nosemosis, siendo más preferible aún la nosemosis tipo A y C.

De esta forma, un tercer objeto de la presente invención lo constituye un método para controlar infecciones por microorganismos patógenos en colmenas de abejas melíferas, que comprende administrar a la colmena la composición alimenticia antes descrita en cualquiera de sus variantes, que contiene en su formulación al menos una fitoalexina en una cantidad comprendida entre 0.1% y 2.8% en peso del total de composición, incluidos ambos límites, en al menos una dosis.

La infección a tratar es en el caso más preferido la nosemosis, siendo más preferible aún la nosemosis tipo A y C.

5 Como se ha dicho anteriormente en relación al producto, el resveratrol y más preferentemente el trans-resveratrol es la fitoalexina de grado farmacéutico de elección preferida, aunque también puede combinarse con otras fitoalexinas, siendo así como normalmente se presenta en las composiciones de fitoalexinas de consumo humano o de calidad alimentaria que se utilizan para preparar la composición. Además, la composición alimenticia puede ser administrada en forma de alimento líquido o de alimento semisólido
10 como se describe en las variantes anteriores, que son preferidas. En el primer caso, el líquido azucarado puede ser preferentemente un jarabe de alimentación de abejas. En el segundo caso, puede ser preferentemente una pasta semisólida azucarada de alimentación de abejas. En ambas variantes de presentación del alimento, el método puede llevarse a cabo de forma más preferida con las composiciones específicas descritas anteriormente
15 para el jarabe y para la pasta semisólida azucarada.

Preferentemente, la composición alimenticia se administra a la colmena repartiéndola entre 1 y 4 dosis (es decir, la dosis total de composición alimenticia se administra en una, dos, tres ó cuatro veces). Cuando la composición es un líquido azucarado, se administra
20 preferentemente en cuatro dosis, mientras que cuando es una pasta semisólida se administra de una vez; esto se debe a que las composiciones líquidas azucaradas, como el jarabe, se consumen más rápido, no pudiéndose administrar en cantidades elevadas de producto porque si se liberara por accidente podría matar a las abejas. Por el contrario, cuando el producto es semi-sólido, este problema no se da y por tanto puede administrarse
25 toda la dosis de una vez. Así, por ejemplo, se puede administrar la composición alimenticia a una colmena forma líquida (jarabe) o en forma semisólida (candy), conteniendo una cantidad de 7 gramos de fitoalexina, concretamente trans-resveratrol. En el primer caso, se administrarían cuatro dosis de 250 gramos de jarabe contiendo cada una 1,75 gramos de fitoalexina (25% de la dosis total de fitoalexinas por colmena). En el segundo caso, se daría
30 una única dosis del candy, siendo de 1 kilogramo de candy que contiene los 7 gramos de fitoalexinas (100% de la dosis de fitoalexinas por colmena, de una vez). En definitiva, independientemente de la forma de presentación, la dosis a administrar de composición alimenticia y de fitoalexinas que contiene es la misma.

También de manera preferida, cuando la composición se administra en más de una dosis, cada dosis se administra con 7 días de intervalo entre ellas.

5 Se ha comprobado que es más conveniente que la administración de la composición alimenticia en primavera se realice en forma de alimento líquido (jarabe), mientras que en otoño es más eficaz la administración como alimento semisólido (candy).

10 Así, se ha constatado un efecto significativo del método descrito en el control de la infección de abejas infectadas por nosemosis, observándose una reducción en la parasitación, es decir, en el número de abejas infectadas por colmena, y en la producción de esporas en dichas abejas infectadas tras la administración de la composición alimenticia.

15 Al poder estar la composición alimenticia constituida por la combinación de un alimento azucarado de abejas común y conocido y una composición de fitoalexinas preparada para su uso humano y con calidad alimentaria, la memoria cubre asimismo un método de control de las infecciones por microorganismos patógenos en colmenas de abejas melíferas, y especialmente de infecciones por nosemosis, siendo más preferible aún la nosemosis tipo A y C, que comprende administrar a la colmena de forma separada pero simultáneamente 20 ambos componentes, alimento azucarado de abejas y composición de fitoalexinas. Dicha administración simultánea de alimento y fitoalexinas se puede realizar siguiendo todas las alternativas y especificaciones planteadas en esta memoria para la composición alimenticia en cuanto a proporciones, tipos de alimentosa y fitoalexinas, etc. y en cuanto al método (formas de administración: cantidades, frecuencias, formas de administración...).

25 **Breve descripción de las Figuras**

Figura 1. Comparación del número de esporas contabilizado en colmenas de abejas infectadas por *N. ceranae* tratadas con o sin resveratrol de acuerdo con el Ejemplo 1. La figura en gris claro representa el grupo R, y la figura de gris oscuro representa al grupo NR.

30 **Figura 2.** Resultados del primer ensayo comentado en el Ejemplo 2.2 de comparación de colmenas tratadas con la composición alimenticia objeto de la presente invención y alimentos que comprenden fumagilina. RJ: resveratrol en jarabe; RC: resveratrol en candy; AF: ácido fórmico; FUMA: fumagilina; CJ: control del tratamiento con jarabe; CC: control del tratamiento con candy; NI: sin intervención.

35

Figura 3. Porcentaje de parasitación medio en cada grupo tratado en el estudio (CR= grupo ensayo con resveratrol adicionado a candy; JR= grupo ensayo con resveratrol adicionado a jarabe; FUM= grupo testigo positivo al que se administró fumagilina; C= grupo testigo solo candy; J= grupo testigo solo jarabe; ST= grupo testigo sin intervención). M1: antes del tratamiento en otoño 2011; M2: después del tratamiento en otoño 2011; M3: antes del tratamiento en primavera 2012; M4: después del tratamiento en primavera 2012; M5: antes del tratamiento en otoño 2012; M2: después del tratamiento en otoño 2012.

Figura 4. Porcentaje de viabilidad medio en los grupos estudiados en abril de 2013. CR= grupo ensayo con resveratrol adicionado a candy; JR= grupo ensayo con resveratrol adicionado a jarabe; FUM= grupo testigo positivo al que se administró fumagilina; C= grupo testigo solo candy; J= grupo testigo solo jarabe; ST= grupo testigo sin intervención.

Figura 5. Producción de miel media en cada grupo en verano 2012. CR= grupo ensayo con resveratrol adicionado a candy; JR= grupo ensayo con resveratrol adicionado a jarabe; FUM= grupo testigo positivo al que se administró fumagilina; C= grupo testigo solo candy; J= grupo testigo solo jarabe; ST= grupo testigo sin intervención.

Ejemplos

Ejemplo 1. Evaluación en laboratorio de la actividad de resveratrol frente a *Nosema spp*

La evaluación de la eficacia del resveratrol requirió realizar previamente ensayos de toxicidad del producto en laboratorio, y para ello se debieron realizar estudios preliminares de solubilidad y valoración de aceptación del resveratrol para determinar la concentración máxima que se puede administrar a las abejas. Dado que los ensayos se deben realizar con abejas de edad controlada, fue necesario tomar cuadros de cría de las colmenas que se introdujeron en incubadores en el laboratorio hasta el nacimiento de las abejas. Por ello estos ensayos solo se pueden realizar en los meses desde mediados de primavera e inicio del otoño.

Se adaptó la metodología siguiendo las recomendaciones de la OECD 213 (GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS. *Honeybees, Acute Oral Toxicity Test*) para la determinación de la toxicidad vía oral del resveratrol. Esta guía indica que para las sustancias de baja toxicidad esperada (como es el resveratrol), se pueden realizar test límites con 100 µg principio activo/abeja. Si la toxicidad es superior a ese valor no se requieren pruebas adicionales de toxicidad.

Tras la realización de varios test, se pudo determinar que la DL50 del resveratrol es superior a 100 µg/abeja, abordando posteriormente los ensayos de eficacia en el laboratorio. En estos estudios, se establecieron 2 grupos con 4 replicados por grupo utilizando abejas nacidas en el laboratorio. Un primer grupo (R) de abejas infectadas individualmente con 160.000 esporas de *N. ceranae*, utilizando la metodología desarrollada y puesta a punto. A los 7 días post-infección, se les administró una dosis (oral) de 6mg/ml que se mantuvo *ad limitum* durante 24 horas. El segundo grupo (NR), estaba formado por abejas infectadas (a la misma dosis que el grupo anterior) a las que no se les suministró resveratrol sino una solución de agua y azúcar. Se tomaron 5 abejas por replicado a los días 9, 10 y 11 días post-infección, que en el grupo R correspondía a 24, 48 y 72 horas después de la administración del resveratrol. Se observó que 72 horas después de la administración se produce una reducción estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en los recuentos de esporas en abejas infectadas por *N. ceranae*.

15

Tabla 1. Comparación del número de esporas contabilizado en colmenas de abejas infectadas por *N. ceranae* tratadas con o sin resveratrol.

	24 h	48 h	72 h
Grupo R (Resveratrol)	40.106.200 (± 16.535.833)	35.106.500 (±12.739.944)	33.253.400* (± 16.203.105)
Grupo NR (No Resveratrol)	40.000.933 (± 11.425.964)	34.710.800 (± 15.008.312)	52.490.000* (± 24.177.759)

Ejemplo 2. Análisis y valoración del método de tratamiento de infestaciones (nosenoma) en colonias de abejas melíferas.

20

2.1 Desarrollo de metodología analítica para análisis de trans-resveratrol y compuestos relacionados en materia prima, miel, polen cera y alimentos para abejas

Con el fin de poder conocer tanto la composición de la materia prima como establecer correctamente la cantidad de resveratrol que debía añadirse al alimento, se han desarrollado métodos basados en el empleo de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detección ultravioleta y fluorescencia.

Los ensayos han sido realizados sobre trans-resveratrol, riqueza mínima del 99%, grado farmacéutico de Megaresveratrol® (Danbury,CT,USA); también se ha ensayado con trans-

30

resveratrol al 50% de pureza de la misma firma comercial. Para conocer la riqueza del producto comercial expedido como suplemento alimenticio aprobado por FDA como fuente de trans-resveratrol y otras fitoalexinas, y puesto que se partió de un etiquetado de riqueza mínima del 99%, se aplicó Cromatografía líquida con detección diodos en fila y fluorescente (HPLC- DAD-FLD) y se encontró que dentro de la variación prevista el producto cumplía la especificación; empleando cromatografía líquida con detección espectrométrica de masas(HPLC-MS) se detectó la presencia de trans-piceido y trazas de cis-resveratrol.

Se hicieron posteriormente análisis de los alimentos suministrados a las abejas, y preparados como se piensa pueden hacer los apicultores en campo, sobre diversas preparaciones siguiendo la dosis recomendada; se encontraron para candy valores comprendidos entre 0,17 y 0,32 mg/L de trans-piceido y entre 7,94 y 8,55 mg/L para trans-resveratrol. En el caso del jarabe los valores oscilaron entre 0,24 y 0,18 mg/L para t-piceido y 6,94 a 8,03 mg/L para trans-resveratrol.

Examinada la variación de los preparados alimenticios con el tiempo se apreció que eran estables por al menos un mes.

Para la evaluación de las cantidades residuales, después de efectuados los tratamientos, se ha aplicado el mismo sistema pero incorporando un detector espectrométrico de masas lo cual no solo ha permitido confirmar la identidad de los analitos sino también rebajar notablemente los límites de detección. La metodología analítica ha sido publicada en *Liquid chromatographic determination of resveratrol and piceid isomers in honey* M. E. Soto, J. Bernal, M^a. T. Martín, M. Higes, J. L. Bernal, M. J. Nozal, Food Analytical Methods, 5 (2011) 162-171, que complementa el estudio sobre la utilización de la fumagilina, sobre cuya eficacia se ha comparado la de la presente invención: *The stability and effectiveness of fumagillin in controlling Nosema ceranae (Microsporidia) infection in honey bees (Apis Mellifera) under laboratory and field conditions*. M. Higes, M. J. Nozal, A. Alvaro, L. Barrios, A. Meana, R. Martín, J. L. Bernal, J. Bernal. Apidologie, 42 (2011) 364-377.

En todas las muestras se han evaluado trans- y cis-resveratrol (t-r y c-r) así como trans- y cis-piceido (t-p y c-p).

En los ensayos realizados con la cantidad teórica máxima de 7 gramos de trans-resveratrol por colmena se analizaron por HPLC-MS las muestras de miel, polen y cera recogidas a

distintos intervalos de tiempo en la colmena así como al momento de la cosecha, los valores encontrados fueron muy variables como sucede siempre en el caso de este tipo de muestras y muestreo.

5 Tabla 2. Contenido total de los diferentes isómeros en miel en función de tipo de alimento en que se ha administrado el resveratrol y el muestreo

Alimento	Muestreo	Concentración total (mgkg ⁻¹)			
		t-p	c-p ^a	t-r	c-r
Candy R	1 ^o	4.4	55.3	206.9	8.9
Candy R	2 ^o	1.6	50.2	209.2	4.5
Jarabe R	1 ^o	2.9	10.5	200.4	4.1
Jarabe R	2 ^o	1.7	36.0	362.3	41.2

^a µgkg⁻¹

10 Tabla 3. Concentraciones (mgkg⁻¹) encontradas de los diferentes isómeros en muestras de polen de colmenas tratadas con resveratrol añadido en candy o jarabe

Tratamiento	Muestra	t-p	c-p	t-r	c-r
Candy R	TN-03	ND	ND	0.44	ND
Candy R	TN-09	ND	ND	0.07	ND
Candy R	TN-19	ND	ND	5.38	0.11
Candy R	TN-23	ND	ND	0.91	ND
Candy R	TN-27	ND	ND	10.29	0.05
Jarabe R	TN-08	ND	ND	0.43	ND
Jarabe R	TN-11	ND	ND	0.23	ND
Jarabe R	TN-14	ND	ND	0.03	ND
Jarabe R	TN-17	ND	ND	1.91	0.05
Jarabe R	TN-29	ND	ND	1.82	0.09

Candy R: candy con resveratrol

Jarabe R: jarabe con resveratrol

15 En cuanto a la acción contra la nosemosis, mostraron una eficacia notable con una reducción en la parasitación que mantuvo a las colmenas en niveles de viabilidad y productivos similares a los grupos que recibieron fumagilina y muy por encima de los grupos testigo que recibieron solo placebo.

2.2. Evaluación en campo de la actividad frente a Nosema spp. del trans-resveratrol y sus isómeros. Determinación de la posología adecuada.

Se partió siempre de trans-resveratrol, bien al 99% o al 50% de la firma Megaresveratrol®.

5 Se iniciaron ensayos en Otoño 2011 con 65 colmenas, divididas en los siguientes grupos: RJ (Resveratrol en jarabe, n=10), RC (Resveratrol en candy, n=10), AF (Ácido fórmico, n=5), FUMA (Grupo testigo positivo, tratado con Fumagilina, n=10), CJ (Grupo testigo sólo con jarabe, n=10), CC (Grupo testigo sólo con candy, n=10), ST (Grupo testigo sin intervención, n=10). El grupo RJ recibió 1,75g MegaResveratrol® en 250 ml de jarabe de azúcar al 50%
10 (4 tratamientos, 1 por semana, lo que supone 6 g en total del producto activo resveratrol) y el grupo RC recibió 7g MegaResveratrol® (6 g en total del producto activo) en 1 kg de candy (glucosa 30%, fructosa 50%, agua 18%). Estos ensayos (excepto el grupo AF y ST) se han continuado en el año 2012, realizándose tratamientos en primavera y otoño. En total se han realizado 6 muestreos, recogidos antes y después de las intervenciones en otoño 2011,
15 primavera de 2012 y otoño de 2012. De esta manera, se dispone de datos de un gran grupo de colmenas que se ha mantenido durante un largo periodo de tiempo, pudiendo así conocer el efecto de los tratamientos (aplicación del resveratrol en diferentes formas y los controles) a largo plazo, obteniendo datos de producción, viabilidad y evolución de las colmenas. También sirvió para determinar el momento más adecuado de aplicación de los
20 tratamientos así como para elegir la mejor forma de aplicación.

Los resultados del primer ensayo de otoño 2011 mostraron que en los grupos que recibieron resveratrol se produjo una reducción en la parasitación (reducción en el número de abejas infectadas por colmena) comparables al grupo que recibió el tratamiento con fumagilina
25 (Figura 2).

Continuando con el estudio de las colmenas durante un año posterior (excepto el grupo AF que se sacó del estudio), se pudo observar que durante la primavera de 2012, el porcentaje de parasitación bajó en todas las colmenas como efecto del aumento de la población que se produce de forma natural en las colmenas durante este periodo. Debido a esto no se pudo
30 observar el efecto de los tratamientos en este periodo. Por el contrario, en el muestreo realizado antes de los tratamientos de otoño 2012, se pudo observar claramente que los porcentajes de parasitación son mucho más elevados en aquellos grupos que no recibieron ningún tratamiento en primavera (C, J) cuando se comparan con los grupos tratados con resveratrol o fumagilina (CR, JR y FUM). El efecto de los tratamientos en otoño también
35

produjo una reducción en el porcentaje de parasitación. La aceptación del resveratrol en otoño es más adecuada en candy que en jarabe, si bien se reduce en primavera, cuando por el contrario las abejas consumen mejor la administración en jarabe. La administración del CR es un sistema cómodo que no requiere de muchas visitas al colmenar, facilitando la labor del apicultor (Figura 3).

La viabilidad de las colonias al final del estudio en los grupos tratados con resveratrol (JR y CR) fue similar a la del grupo que se trató con fumagilina (Figura 4). Aunque los resultados de producción de miel solo fueron significativamente mayores en el grupo FUM (Figura 5).

Por todo ello, el resveratrol muestra ser eficaz para el tratamiento y control de la Nosemosis. Si bien el efecto en la reducción de la parasitación es más evidente en otoño, la administración del producto en primavera facilita que las colmenas lleguen al otoño en con unos niveles de parasitación menores.

En cuanto a los residuos, podemos observar que la miel puede presentar resveratrol de forma natural ya que se ha detectado en los grupos no tratados (C y J) aunque en cantidades mucho menores que en los grupos tratados (CR y JR). En estos últimos se puede encontrar trans-resveratrol en cantidades hasta 1000 veces superiores. Las otras formas isoméricas que se detectan en mayor proporción son el trans-piceido y el cis-resveratrol.

Tabla 4: Concentraciones en microgramo por kilogramo, obtenidas por HPLC-MS, de los distintos isómeros encontrados en mieles procedentes de colmenas tratadas. Primer muestreo (1) entre 2-6 diciembre de 2011. Segundo muestreo (2) entre 9-10 enero de 2012.

		t-p		c-p		t-r		c-r	
		1	2	1	2	1	2	1	2
TN-03	CR	874.3	127.7	6.8	ND	32.3a	24.3a	1.3a	135.0
TN-07	CR	19.3	9.3	NQ	NQ	730.9	389.7	363.8	9.5
TN-09	CR	537.4	NQ	17.8	NQ	21.6a	29.2	1.9a	NQ
TN-13	CR	NQ	ND	NQ	ND	318.5	NQ	21.2	ND
TN-16	CR	4.9	NQ	NQ	NQ	211.7	535.2	23.4	NQ
TN-19	CR	250.9	878.1	NQ	15.4	8.6a	93.0a	518.1	2.0a
TN-23	CR	4.6	ND	NQ	ND	738.2	93.0	367.3	NQ
TN-27	CR	657.0	31.9	9.2	NQ	28.3a	11.3a	1.3a	15.0
TN-31	CR	2.1a	365.2	21.5	14.7	114.1a	34.0a	3.2a	403.6
TN-35	CR	ND	213.1	ND	20.1	12.6	16.5a	10.5	2.0a
TN-01	JR	380.1	16.7	NQ	6.2	28.9a	70.8a	431.4	1.0a
TN-04	JR	ND	21.5	ND	5.8	12.0	47.5	ND	NQ

TN-08	JR	NQ	ND	NQ	ND	35.7	7.7	11.2	ND
TN-11	JR	9.7	77.1	NQ	5.4	348.7	3.7a	41.1	36.6
TN-14	JR	NQ	27.3	NQ	6.9	132.9	62.8a	15.1	1.7a
TN-17	JR	NQ	509.6	NQ	8.5	75.3	151.6a	12.9	1.2a
TN-21	JR	NQ	7.3	NQ	NQ	38.9	209.4	12.4	8.4
TN-25	JR	NQ	ND	ND	ND	30.4	10.1	10.9	ND
TN-29	JR	1.8a	99.0	10.5	NQ	124.7a	12.2a	3.0	90.7
TN-33	JR	725.5	935.7	NQ	3.2	46.2a	60.9a	488.7	690.8
PR-11-03	ST	NQ	NQ	NQ	NQ	10.9	5.1	ND	ND
PR-11-10	ST	ND	ND	NQ	NQ	11.5	NQ	ND	ND
PR-11-20	ST	ND	ND	ND	ND	11.3	36.1	ND	ND
PR-11-22	ST	ND	ND	ND	ND	11.1	ND	ND	ND
PR-11-31	ST	ND	ND	ND	ND	11.1	NQ	ND	ND
PR-11-34	ST	ND	ND	ND	ND	11.0	NQ	ND	NQ
PR-11-01	C	ND	NQ	ND	NQ	48.2	47.1	14.5	NQ
PR-11-04	C	NQ	NQ	ND	NQ	ND	6.4	ND	ND
PR-11-07	C	ND	ND	NQ	NQ	16.0	NQ	ND	ND
PR-11-14	C	ND	ND	ND	ND	10.0	ND	ND	ND
PR-10	C	ND	NQ	NQ	NQ	10.9	NQ	ND	ND
PR-11-28	C	ND	ND	ND	ND	61.7	NQ	14.2	ND
PR-11-09	J	ND	NQ	ND	NQ	45.3	NQ	ND	ND
PR-11-12	J	ND	ND	ND	ND	ND	10.7	ND	NQ
PR-11-15	J	NQ	NQ	NQ	NQ	16.0	NQ	ND	ND
PR-11-17	J	NQ	NQ	ND	ND	11.4	NQ	ND	ND
PR-11-33	J	ND	ND	ND	ND	10.8	NQ	10.7	ND

a: mg/kg

Tabla 5. Límites de detección (LOD) y Cuantificación (LOQ) en $\mu\text{g}/\text{kg}$ obtenidos en LC-MS para los distintos isómeros

Analito	LOD	LOQ	Analito	LOD	LOQ
t-p	0.51	1.71	c-r	0.98	3.25
c-p	0.98	3.25	t-r	1.84	6.13

REIVINDICACIONES

1. Una composición alimenticia de abejas melíferas azucarada que contiene en su formulación al menos una fitoalexina en una cantidad comprendida entre 0.1% y 2.8% en peso del total de composición, incluidos ambos límites.
5
2. La composición alimenticia de la reivindicación anterior, que contiene una fitoalexina que es trans-resveratrol y al menos una segunda fitoalexina.
3. La composición alimenticia de la reivindicación anterior, donde la al menos una segunda fitoalexina es seleccionada dentro del grupo compuesto por cis-resveratrol, un isómero de piceido y cualquier combinación de los mismos.
10
4. La composición alimenticia según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el 99% del total de fitoalexinas que contiene es trans-resveratrol.
15
5. La composición alimenticia de la reivindicación anterior, donde el 99,95% del total de fitoalexinas que contiene es trans-resveratrol.
6. La composición alimenticia según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es seleccionada entre una composición líquida en solución azucarada y una composición semisólida en forma de pasta azucarada con un grado de humedad inferior al 50%.
20
7. La composición alimenticia de la reivindicación anterior, donde la composición líquida es un jarabe, y contiene la al menos una fitoalexina en una cantidad comprendida entre 0.4% y 2.8% en peso total de composición, incluido ambos límites.
25
8. La composición de la reivindicación anterior, donde el jarabe contiene entre 1.5 gramos y 1.75 gramos de fitoalexina por cada 250 ml de jarabe de azúcar al 50% de agua.
9. La composición alimenticia de la reivindicación 6, donde la composición semisólida en forma de pasta azucarada con un grado de humedad inferior al 50% es una pasta de azúcares o miel que contiene entre 0.1% y 0.7% en peso total de composición, incluido ambos límites.
30

10. La composición alimenticia de la reivindicación anterior, donde la pasta de azúcares o miel contiene entre 5 y 7 gramos de fitoalexina por cada 1 kg de pasta que comprende en su formulación:

- 5 · 30% de glucosa
- 50 % de fructosa
- 18% agua, y
- 2% de otros componentes.

10 11. Composición alimenticia según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un componente seleccionado dentro del grupo compuesto por vitaminas, aminoácidos y una combinación de ambos.

15 12. Un método para controlar infecciones por microorganismos patógenos en colmenas de abejas melíferas, que comprende administrar a la colmena la composición alimenticia descrita en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, dicha composición administrándose en al menos una dosis.

20 13. El método de la reivindicación anterior, donde la infección es por *Nosema apis* y/o *Nosema ceranae*, causantes de las nosemosis tipo A y C.

14. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 13, donde la composición se administra en una única dosis si se presenta en forma de una pasta semisólida, y en 4 dosis cuando se presenta en un líquido azucarado.

25 15. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, donde cuando la composición se administra en más de una dosis, las dosis se administran con 7 días de intervalo entre ellas.

30 16. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, donde en primavera la composición alimenticia se administra en forma de solución azucarada, y en otoño se administra en forma de pasta azucarada con humedad inferior al 50%.

35 17. Uso de la composición alimenticia descrita en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para el control de infecciones por microorganismos patógenos en colmenas de abejas melíferas, donde la infección es por *Nosema apis* y/o *Nosema ceranae*.

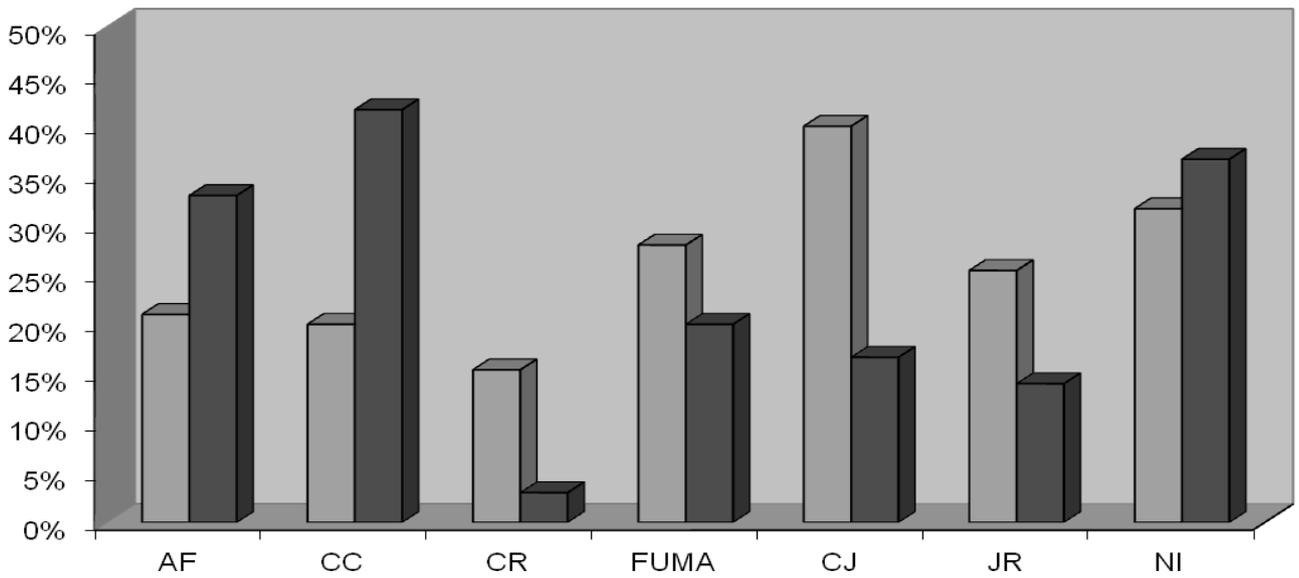
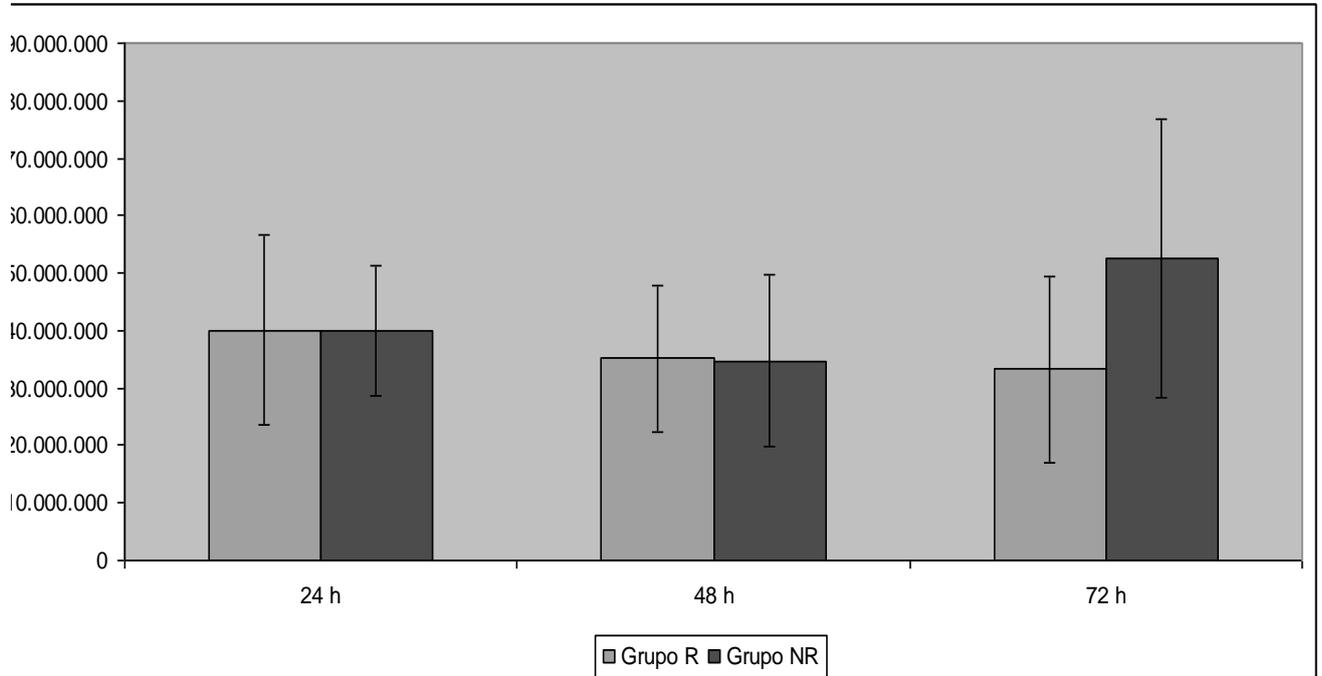


FIG. 2

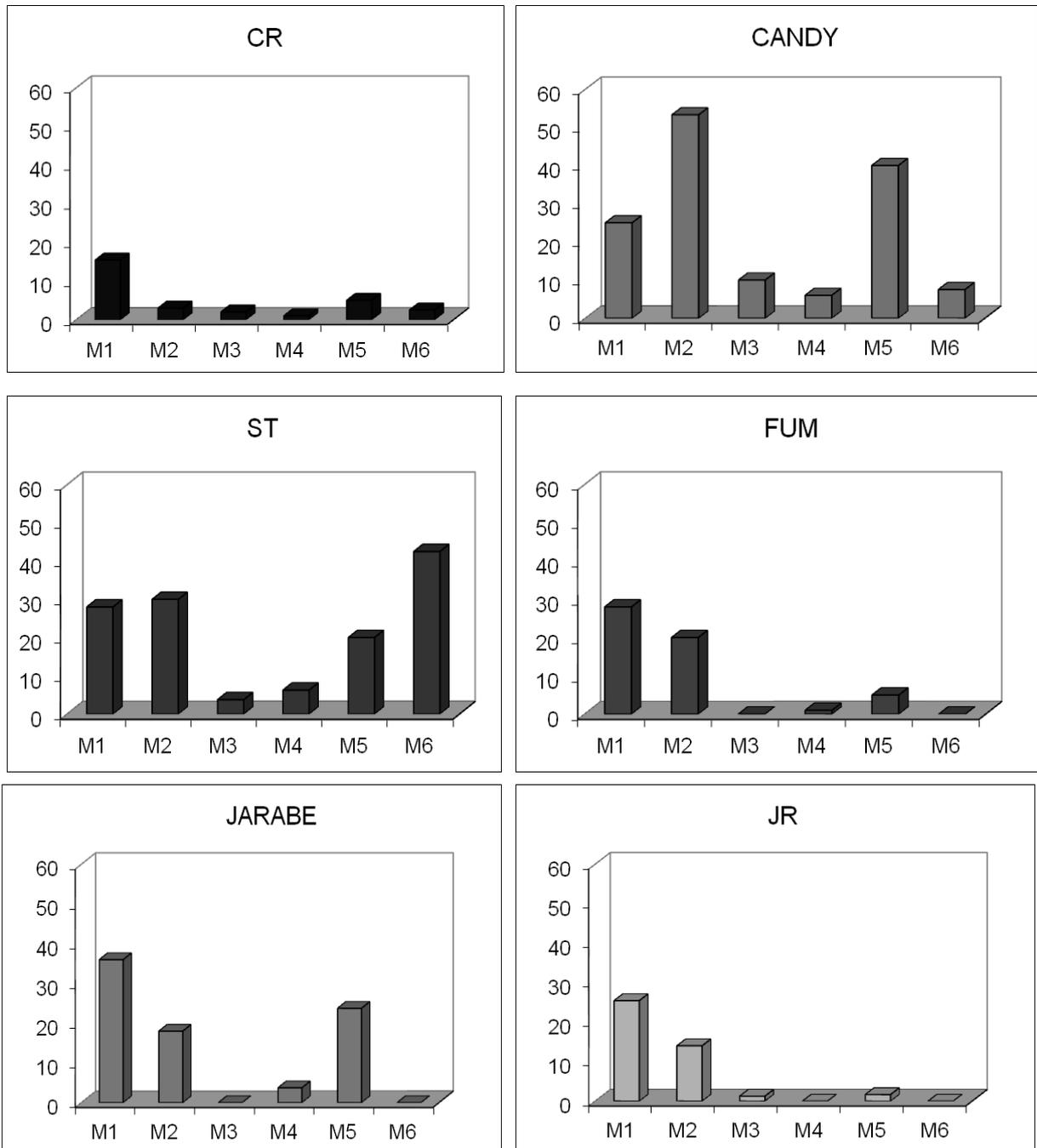


FIG. 3

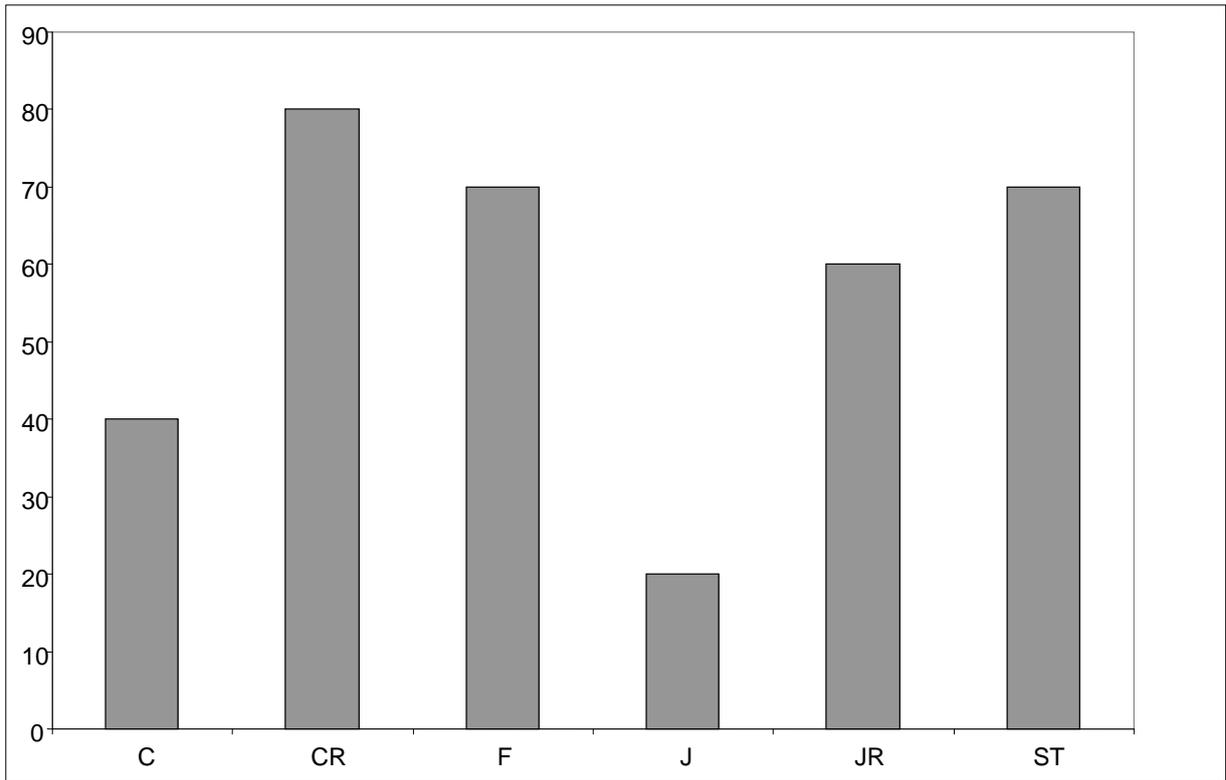


FIG. 4

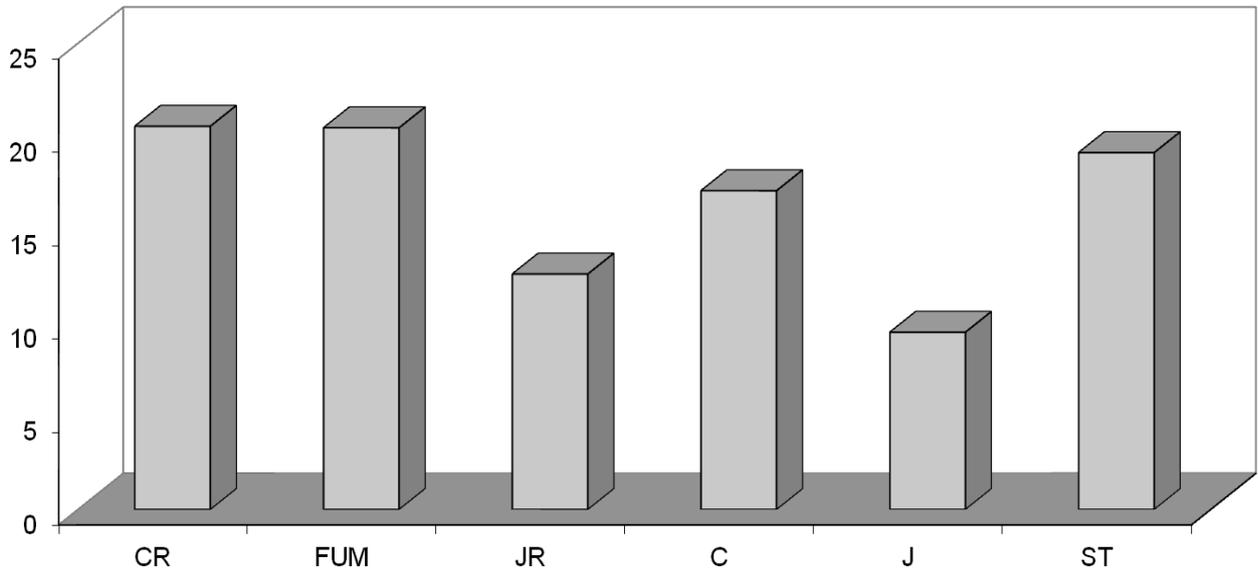


FIG. 5



21 N.º solicitud: 201331155

22 Fecha de presentación de la solicitud: 26.07.2013

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: **A23K1/18** (2006.01)
A01N31/08 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	SOTO SARRIA, ME: "DETERMINACIÓN DE CIS-/TRANS-ESTILBENOS(RESVERATROL Y PICEIDO), TRIPTÓFANO Y METABOLITOS EN PRODUCTOS APÍCOLAS POR CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS", Tesis Doctoral, 2012 [Recuperado el 07.10.2013] Recuperado de Internet: URL: http://uvadoc.uva.es/bitstream/10324/1712/1/TESIS213_121025.pdf ; página 4, último párrafo; página 39, último párrafo; página 40, último párrafo; páginas 79-82; página 169, último párrafo y página 170, primer párrafo.	1-17
X	COSTA CECILIA et al. Effect of thymol and resveratrol administered with candy or syrup on the development of <i>Nosema ceranae</i> and on the longevity of honeybees (<i>Apis mellifera</i> L.) in laboratory conditions. <i>Apidologie</i> MAR-ABR 2010 (03.2010) VOL: 41 No: 2 Págs: 141-150 ISSN 0044-8435(print) ISSN 1297-9678(electronic) Doi: doi:10.1051/apido/2009070.	1-17
X	MAISTRELLO LARA et al. Screening of natural compounds for the control of <i>Nosema</i> disease in honeybees (<i>Apis mellifera</i>). <i>Apidologie</i> JUL-AGO 2008 (07.2008) VOL: 39 No: 4 Págs: 436-445 ISSN 0044-8435 Doi: doi:10.1051/apido:2008022.	1-17
A	US 5070091 A (MEHLHORN HEINZ et al.) 03.12.1991, todo el documento.	1-17
A	WO 2010128465 A1 (BEEOLOGICS LLC et al.) 11.11.2010, todo el documento.	1-17
A	WO 2010146405 A2 (FENDRIK PETER) 23.12.2010, todo el documento.	1-17
A	DE 4215534 C1 (MERCKLE GMBH) 17.06.1993, todo el documento.	1-17

Categoría de los documentos citados

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
10.10.2013

Examinador
A. Maquedano Herrero

Página
1/4

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

A23K, A01N

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 10.10.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 2, 3 y 5	SI
	Reivindicaciones 1, 4,6, 7-17	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-17	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	SOTO SARRIA, ME: "DETERMINACIÓN DE CIS-/TRANS-ESTILBENOS(RESVERATROL Y PICEIDO), TRIPTÓFANO Y METABOLITOS EN PRODUCTOS APÍCOLAS POR CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS", Tesis Doctoral, 2012 [Recuperado el 07.10.2013] Recuperado de Internet: URL: http://uvadoc.uva.es/bitstream/10324/1712/1/TESIS213_121025.pdf	
D02	COSTA CECILIA et al. Effect of thymol and resveratrol administered with candy or syrup on the development of <i>Nosema ceranae</i> and on the longevity of honeybees (<i>Apis mellifera</i> L.) in laboratory conditions. <i>Apidologie</i> MAR-ABR 2010 (03.2010) VOL: 41 No: 2 Págs: 141-150 ISSN 0044-8435(print) ISSN 1297-9678(electronic) Doi: doi:10.1051/apido/2009070.	28.02.2010
D03	MAISTRELLO LARA et al. Screening of natural compounds for the control of <i>Nosema</i> disease in honeybees (<i>Apis mellifera</i>). <i>Apidologie</i> JUL-AGO 2008 (07.2008) VOL: 39 No: 4 Págs: 436-445 ISSN 0044-8435 Doi: doi:10.1051/apido:2008022.	30.06.2008
D04	US 5070091 A (MEHLHORN HEINZ et al.)	03.12.1991
D05	WO 2010128465 A1 (BEEOLOGICS LLC et al.)	11.11.2010
D06	WO 2010146405 A2 (FENDRIK PETER)	23.12.2010
D07	DE 4215534 C1 (MERCCKLE GMBH)	17.06.1993

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

La solicitud reivindica una composición alimenticia azucarada para abejas melíferas que contiene en su formulación, al menos, una fitoalexina (trans-resveratrol). Esta composición puede contener una segunda fitoalexina (cis-resveratrol, piceido o una mezcla de ambos). La composición puede elaborarse en forma líquida en disolución azucarada o en forma semisólida como pasta azucarada. Dependiendo de la época del año en que se suministre a las abejas dicha composición, se hará en una u otra forma.

El principal objeto de la composición es la de controlar infecciones provocadas por microsporidios del género *Nosema* en colmenas de abejas.

La solicitud reivindica asimismo el método para controlar la infección mediante la composición y el uso de la misma.

D01-D07 representan el estado de la técnica anterior. De ellos D01 es el más cercano. Es una tesis doctoral en la que se estudian composiciones alimenticias para abejas, que contienen trans-resveratrol y sus posibles efectos en el control de las infecciones por *Nosema spp.* en las colmenas. Las concentraciones y las condiciones empleadas en el estudio son similares a las reivindicadas en la solicitud. La única diferencia entre D01 y la solicitud estriba en que en algunas reivindicaciones de la solicitud se reivindica la coexistencia en la composición de trans-resveratrol, cis-resveratrol y/o piceido (otra fitoalexina), mientras que en D01 sólo se emplea trans-resveratrol. Por otro lado, hay que tener en cuenta que en la solicitud se reivindican concentraciones de trans-resveratrol del 99.95% del total de las fitoalexinas de la composición. También hay que considerar que en la solicitud no se describe en ningún momento un efecto inesperado o una sinergia provocados por la utilización de piceido y/o cis-resveratrol (0.05% de fitoalexinas totales) en los efectos de la composición sobre el control de las infecciones por *Nosema spp.*

D02 y D03 se refieren a la utilización de trans-resveratrol en la fabricación de composiciones alimenticias para abejas melíferas para el control de infecciones provocadas por *Nosema* en las colmenas. Las concentraciones utilizadas en D02 y D03 son menores que las reivindicadas en la solicitud. El utilizar una concentración mayor del principio activo para aumentar el efecto que se quiere conseguir, en este caso el mejor control de la infección por *Nosema* en abejas melíferas, parecería obvio a los ojos de un experto en la materia.

Por todo ello, se considera que las reivindicaciones 1, 4, 6, 7-17 de la solicitud no cumplen los requisitos de novedad en el sentido del artículo 6.1 de la Ley 11/1986 ni de actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 de la Ley 11/1986. Las reivindicaciones 2, 3 y 5 sí que cumplen el requisito de novedad, pero no el de actividad inventiva.