

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 681 219**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/02** (2006.01)

**G01N 33/04** (2006.01)

**G01N 30/88** (2006.01)

**G01N 15/00** (2006.01)

**G01N 1/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.09.2011 PCT/DE2011/075213**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.04.2012 WO12048695**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.09.2011 E 11831823 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.05.2018 EP 2614352**

54 Título: **Dispositivo para extraer una muestra representativa y no destructiva de partículas de material a granel y procedimiento para la extracción mediante el dispositivo**

30 Prioridad:

**09.09.2010 DE 102010037425**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**12.09.2018**

73 Titular/es:

**EUROFINS WEJ CONTAMINANTS GMBH (100.0%)  
Neuländer Kamp 1  
21079 Hamburg, DE**

72 Inventor/es:

**BISELLI, SCARLETT y  
NKENGFACK, NGNINTENDEM JAMES**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 681 219 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Dispositivo para extraer una muestra representativa y no destructiva de partículas de material a granel y procedimiento para la extracción mediante el dispositivo

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para detectar al menos una contaminación por micotoxinas en material a granel, adicionalmente se describe un dispositivo para extraer una muestra de partículas de material a granel así como un procedimiento para extraer partículas de material a granel mediante el dispositivo descrito y el uso del dispositivo descrito.

10 Las micotoxinas son productos metabólicos secundarios de los mohos. Las micotoxinas ejercen efectos tóxicos ya en cantidades mínimas. Por lo tanto, las micotoxinas en los alimentos y los piensos representan un riesgo grave para la salud. Los efectos de las micotoxinas en los mamíferos pueden ser muy diversos. Se sabe que pueden tener, entre otras cosas, un efecto carcinogénico, neurotóxico o inmunosupresor en los mamíferos. Además de esto, también se han descrito reacciones alérgicas a las micotoxinas. Actualmente se conocen numerosas micotoxinas que pueden ser producidas por diversas especies de hongos. Las micotoxinas conocidas son, entre otras, las aflatoxinas, los alcaloides del cornezuelo, la ocratoxina A (OTA), las toxinas de *Fusarium* como el desoxinivalenol (DON) y la zearalenona (ZEA) y las toxinas del *Penicillium* como la citrinina. En este sentido, la ZEA y el DON representan, por ejemplo, las principales micotoxinas en los cereales, la OTA es la principal micotoxina en el café verde, mientras que las nueces están principalmente contaminadas con aflatoxinas. En vista del grave riesgo para la salud que ejercen las micotoxinas, durante los últimos años se han realizado correspondientemente grandes esfuerzos para desarrollar y mejorar procedimientos de análisis en este campo. En general, se usan tanto procedimientos de cromatografía líquida con detección de fluorescencia y espectrometría de masas como inmunoensayos (Schuhmacher y col., 2008; Shephard, 2009; Maragos y Busman, 2010). Además de con las micotoxinas, los alimentos pueden estar contaminados con otros contaminantes o impurezas. Ejemplos de esto son metales tóxicos o compuestos de metales tales como arsénico, antimonio o zinc, productos fitosanitarios, tales como pesticidas, fungicidas, insecticidas o herbicidas u organismos modificados genéticamente.

25 En vista del hecho de que las micotoxinas y otros contaminantes o residuos perjudiciales están distribuidos de forma muy heterogénea en los alimentos y los piensos, especialmente la extracción y la preparación de una muestra de los alimentos que deben analizarse representa un gran desafío (Biselli y col., Mycotoxin Res. 24 (2), (2008), 98-104; Miraglia y col., Food Addit. Contam. Supl 1, (2005), 31-36). El enfoque actualmente prescrito por el derecho alimentario según el Reglamento CE 401/2006 "Métodos de muestreo y análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios" prevé la homogeneización de varios kilogramos de material a granel suelto, la denominada mercancía a granel. Dado que muchos componentes de la matriz alteran los procedimientos de análisis y dificultan o incluso impiden dado el caso una cuantificación de las micotoxinas, habitualmente se realizan procedimientos de purificación bastante caros y complejos después de la homogeneización, como extracción en fase sólida, microextracción en fase sólida o cromatografía de afinidad (Senyuva y Gilbert, J Chromatogr. B Analyt Technol Biomed Life Sci, 878 (2), (2010), 115-32; Biselli y Hummert, Food Addit. Contam. 22 (8), (2005), 752-60). La toma de muestras y la preparación de muestras se caracterizan por ello en su totalidad por una gran necesidad de tiempo y esfuerzo.

40 Ya se han descrito diferentes lancetas de toma de muestras para una toma de muestras más fácil. En el documento EP 0 411 932 B1 se describe una sonda de muestras para la extracción de una muestra parcial representativa de cereal y harina. En el documento EP 1 221 605 B1 se describe una lanceta de toma de muestras portátil en forma de lanza para la extracción de una muestra de polvo.

El documento US 6.324.927 B1 describe un procedimiento y dispositivo para la toma de muestras de contaminantes, en el que la muestra se expone a vibraciones dentro de una cámara hermética al aire en presencia de un gas portador, lo que da como resultado la liberación de partículas de polvo.

45 Stroka y col., Toxicology Letters, 153 (2004), 99-107 describen la toma de muestras de diferentes productos alimenticios a granel con ayuda de una lanceta de toma de muestras o el sistema de toma de muestras DiscoveryCERT FQS™. La cantidad de polvo de la muestra se recoge en diferentes materiales filtrantes y se analiza mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) así como procedimientos de espectroscopía IR de transformada de Fourier (FTIR). Sin embargo, no se puede determinar una correlación clara e inequívoca de las contaminaciones de polvo y muestra total.

55 La desventaja de los procedimientos actualmente conocidos es que estos procedimientos requieren una obtención de muestras usando filtros de fibra de vidrio o membranas. Sin embargo, este tipo de recogida de muestras solo permite una evaluación de esta muestra en forma de análisis individual. Por lo tanto, no es posible una nueva verificación o la repetición del análisis de la muestra recogida. Además, no se puede determinar una clara correlación con respecto a la contaminación con micotoxinas u otros contaminantes de la muestra extraída en comparación con la muestra global mediante las muestras así obtenidas. Por consiguiente, estas muestras obtenidas con los procedimientos disponibles actualmente no constituyen muestras representativas. Por lo tanto, se reduce claramente la importancia de una muestra que no proporciona una indicación inequívoca sobre la contaminación real con micotoxinas u otros contaminantes. Además, también es desventajoso de los procedimientos

actualmente conocidos que los mismos son en parte técnicamente muy complejos. Esto implica posibles fuentes de errores y ocasiona además costes elevados para la adquisición y el funcionamiento de tales dispositivos.

5 A la vista de estos inconvenientes mencionados anteriormente de los procedimientos del estado conocido de la técnica se describe una extracción de muestras mejorada y representativa para material a granel de alimentos y piensos, la denominada mercancía a granel. Además, se describe un procedimiento que se puede realizar fácilmente, que es económico y requiere menos esfuerzo. El problema técnico que subyace a la presente invención es la provisión de un procedimiento fiable y representativo para la detección de una contaminación por micotoxinas.

Este problema técnico subyacente se resuelve por el objeto definido en las reivindicaciones.

10 Un primer objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento para la detección de al menos una contaminación por micotoxinas en material a granel, que comprende las etapas: (a) extraer una muestra de partículas con un tamaño de partícula de 0,1 mm y 1,0 mm de material a granel; (b) analizar las partículas extraídas; y (c) detectar una contaminación por micotoxinas mediante la determinación de la concentración de la contaminación por micotoxinas y (d) inferir la contaminación real por micotoxinas del material a granel correlacionando la concentración en la muestra determinada en la etapa (c) con aquella de una muestra global del material a granel.

15 De acuerdo con la invención, por "contaminaciones" se entiende, en particular, impurezas de los alimentos. Tales impurezas comprenden micotoxinas, metales tóxicos o compuestos de metales, tales como arsénico, antimonio o zinc, productos fitosanitarios, tales como pesticidas, fungicidas, insecticidas o herbicidas, u organismos modificados genéticamente.

20 Las micotoxinas comprenden sobre todo ocratoxinas, aflatoxinas, alcaloides del cornezuelo, toxinas de *Fusarium*, tales como en particular desoxinivalenol (DON) y zearalenona (ZEA), toxinas de *Alternaria* y citrinina.

Según la invención, las micotoxinas en el procedimiento de acuerdo con la invención para la detección de al menos una concentración de micotoxinas se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en ocratoxinas, aflatoxinas, alcaloides del cornezuelo, toxinas de *Fusarium*, tales como en particular desoxinivalenol y zearalenona, toxinas de *Alternaria* y citrinina.

25 En una realización preferida de la invención está previsto que el tamaño de partícula de la muestra extraída presente un tamaño de 0,1 mm a 0,7 mm, más preferentemente de 0,2 mm a 0,5 mm.

30 En una realización preferida adicional, el análisis se lleva a cabo mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía de rendimiento ultra-alto (UPLC), espectroscopía IR de transformada de Fourier (FTIR), resonancia magnética nuclear (*nuclear magnetic resonance*, RMN), análisis directo en tiempo real (DART) o ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA).

35 Se describe adicionalmente un dispositivo para extraer una muestra de partículas de material a granel con una unidad de separación (100) y una unidad de succión (110) para extraer la muestra por una corriente de aire que conduce desde la unidad de separación a la unidad de succión, que comprende un canal (20) con una abertura (25) dirigida aguas arriba, en la que está dispuesta una sonda (30), con un tamiz (35), un ciclón (40) dispuesto aguas abajo del canal (20) y perpendicularmente al canal (20) con un recipiente (45) dispuesto por debajo del ciclón (40), un canal (50) conducido al interior del ciclón (40), que lleva aguas abajo a un filtro (55), un canal (60) de descarga aguas abajo del filtro (55), que conduce desde el filtro (55) a la unidad de succión (110), con una válvula (65) y un canal (70) que se ramifica desde el canal (60), con un manómetro (75) dispuesto en el extremo del canal (70), en el que la unidad de succión (110) es un ventilador de aire, que genera una velocidad de la corriente de aire en el canal (20) preferentemente de 30 a 70 m/s.

En el contexto de la presente invención se entiende por "material a granel" una mezcla de productos individuales sueltos en forma granular o de trozos, que está presente en forma fluida. Según la invención, por "material a granel" se entiende en particular material a granel de alimento y pienso, tal como granos de cereales, por ejemplo trigo, maíz, centeno o cebada, así como harina, sal, azúcar, nueces o café.

45 Se describe en el presente documento que "aguas arriba" se entiende como una orientación que presenta una distancia mayor en la relación dimensional con respecto a la unidad de succión y la corriente de aire producida en la misma en cuanto a la longitud. Correspondientemente, "aguas abajo" se entiende como una orientación que presenta una distancia inferior en la relación dimensional con respecto a la unidad de succión y la corriente de aire producida en la misma en cuanto a la longitud.

50 Por "perpendicular" se entiende una alineación que tiene esencialmente un ángulo de 90°. Además, "perpendicular" también se entiende como una alineación que prevé un ángulo que se desvía de un ángulo de 90°, por ejemplo en un intervalo de 45° a 135°. Se prevé que una alineación perpendicular se entienda como la alineación en la que el canal (20) está alineado en relación con el ciclón (40) de modo tal que la corriente de aire con las partículas alcanza el ciclón (40) de tal manera, que las partículas se introducen tangencialmente y así llegan a una trayectoria circular en el ciclón.

Por "canal" se entiende una conexión, en particular una conexión tubular, tal como un tubo, una manguera o una tubería.

Las contaminaciones, como aquellas por micotoxinas, generalmente están distribuidas de manera muy heterogénea dentro del material a granel. Esto significa que las contaminaciones, en particular las micotoxinas, están presentes distribuidas de manera inconsistente e irregular dentro del material a granel. Por lo tanto, no se puede asumir que ya al extraer una muestra discrecional se pueda detectar correctamente una contaminación, ya que existe una gran probabilidad de que esta muestra solo esté contaminada en realidad en una cantidad pequeña. Sin embargo, es posible que en ciertas circunstancias esto no refleje la situación real, ya que la totalidad del material a granel posiblemente esté contaminado en una cantidad claramente más alta en comparación con lo que se ha detectado en una sola muestra. En consecuencia, en vista de la distribución no homogénea de las contaminaciones, hay que temer que cada muestra individual refleje diferentes concentraciones de las contaminaciones. Sin embargo, se debe concluir por ello que una sola muestra no es significativa y representativa por sí misma para deducir sobre esta base la contaminación real de todo el material a granel.

En vista de esto, existen prejuicios en relación con un procedimiento que se basa en la extracción de una única muestra más pequeña, como una muestra de partículas, para determinar la contaminación de todo el material a granel de esta manera.

Sorprendentemente, sin embargo, con el procedimiento de acuerdo con la invención para detectar al menos una contaminación en el material a granel es posible permitir una detección fiable y significativa de una contaminación incluso mediante la extracción de una muestra de partículas con un tamaño de 0,1 mm a 1,0 mm. Se ha podido demostrar que la muestra de partículas presenta una contaminación que de hecho se distingue de la contaminación de la muestra global. Por lo tanto, la concentración de la contaminación de la muestra de partículas puede ser, por ejemplo, claramente mayor en comparación con la muestra global. Sorprendentemente, se pudo demostrar que la muestra de partículas extraída con un tamaño de partícula de 0,1 mm a 1,0 mm constituye una muestra de partículas representativa, que proporciona información sobre la concentración real de la contaminación de la muestra global. Al correlacionar la concentración de la contaminación de la muestra de partículas con la de la muestra global, se pudo confirmar que la muestra de partículas permite inferir la contaminación real.

De acuerdo con la invención, "detección fiable" o "detección significativa" se entiende como una detección que determina la presencia de una contaminación de alimentos en material a granel en una cantidad significativa, de modo que se consigue un resultado seguro según bases estadísticas.

Sorprendentemente, pudo demostrarse además que con el dispositivo descrito en el presente documento pueden obtenerse muestras de un tamaño de partícula determinado, que después del análisis con respecto a micotoxinas como contaminación se correlacionan en una concentración de micotoxinas determinada en gran medida con la concentración de micotoxinas de la muestra global del material a granel analizado. Esta extracción de muestras representativa ventajosa se posibilita mediante la obtención de la muestra a través del separador centrífugo, también llamado ciclón. En el contexto de la presente invención se entiende por "representativa" la propiedad de una muestra de reflejar características determinadas de la muestra, tales como contaminaciones con micotoxinas o toxinas vegetales o microbianas, de tal manera que esta muestra se correlaciona con la muestra global en gran medida con respecto a características determinadas. El ciclón permite una separación de partículas que están incluidas en la corriente de aire generada por la unidad de succión. Se describe que el ciclón tiene una forma cónica, que se estrecha hacia abajo. Adicionalmente se describe que la mezcla de corriente de aire/partículas se introduce tangencialmente en el ciclón. De este modo, las partículas incluidas en la corriente de aire se dirigen a una trayectoria circular. Debido al estrechamiento de la forma cónica del ciclón, la velocidad de rotación de la corriente de aire se eleva de manera tal que las partículas se lanzan contra la pared de cono del ciclón debido al desarrollo de la fuerza centrífuga. Por lo tanto, se describe que se extraen aquellas muestras de partículas que poseen un tamaño de partícula determinado del material a granel que debe analizarse.

Se describe además que el ciclón permite el ajuste de una corriente de aire con una fuerza de succión determinada, por lo que pueden aislarse y extraerse específicamente partículas con un tamaño deseado. Se pudo demostrar que con el dispositivo descrito en la presente memoria se pueden aislar partículas con un tamaño de partícula determinado, que presentan una alta carga de micotoxinas. Las micotoxinas se acumulan en la superficie en una cantidad notable. Las partículas con un diámetro menor poseen una relación superficie/volumen más alta en comparación con las partículas con un diámetro mayor. En consecuencia, las partículas con un menor tamaño con una relación volumen/superficie más alta están cargadas con micotoxinas en mayor medida en comparación con las partículas con un tamaño mayor y una relación de volumen/superficie comparativamente menor. Mediante el dispositivo descrito en la presente memoria, es posible, por tanto, obtener muestras en particular de un intervalo de tamaños de partícula que representan en alto grado en su concentración de micotoxinas la carga total con micotoxinas en el material a granel. Por lo tanto, con el dispositivo descrito en la presente memoria se consigue ventajosamente que obteniendo muestras de un tamaño de partícula determinado puedan aislarse muestras muy representativas, por lo que la carga con micotoxinas en el material a granel global puede determinarse de una manera fácil y fiable.

Se describe un dispositivo, en el que la unidad de separación (100) comprende esencialmente un ciclón (40), un

recipiente (45), un canal (50), un filtro (55), una válvula (65), un canal (70) y un manómetro (75).

Se describe adicionalmente que se introduce la sonda (30) en una unidad de movilización (130) con una abertura (135), de la cual se obtiene la muestra del material a granel.

5 Se describe en el presente documento que la unidad de movilización (130) es un mezclador de tambor, que presenta preferentemente una velocidad de rotación de 10 a 120 rpm, preferentemente de 15 a 100 rpm, más preferentemente de 15 a 80 rpm, más preferentemente de 15 a 50 rpm, más preferentemente de 15 a 30 rpm, en particular preferentemente de 28 rpm. Se describe que tales velocidades de rotación permiten una extracción no destructiva de la muestra del material a granel. Por "no destructiva" se entiende la propiedad de una muestra para estar presente en un estado intacto y completo.

10 Se describe que la unidad de movilización (130) es un vibrador, un transportador vibratorio o una corriente de aire generada por un soplador.

La unidad de movilización (130) consiste en hierro o acero con un motor. Se describen adicionalmente metales, aleaciones de metales o también plásticos, polímeros.

15 La unidad de movilización (130) presenta un diámetro de 20 a 100 cm, adicionalmente de 30 a 60 cm, en particular de 50 cm.

20 Se describe que la sonda (30) presenta un diámetro de 2 cm a 25 cm, además de 4 cm a 10 cm, en particular de 7 cm. Se describe que se puede lograr una ampliación de la distancia de partículas mediante una ampliación del diámetro de la sonda. En consecuencia, el uso de una sonda con un diámetro mayor permite el mantenimiento de una mayor distancia con respecto a las partículas que deben recogerse. De este modo, es posible que la muestra de partículas se pueda extraer con una distancia espacial flexible, sin necesidad de que la sonda deba colocarse en la proximidad directa del material a granel que debe analizarse. La sonda (30) consiste en polietileno (PE).

Como alternativa se describen materiales adicionales de plástico, polímeros, vidrio o metal.

25 Se describe que el tamiz (35) en la sonda (30) es un tamiz metálico. Se describe adicionalmente que el tamiz (35) está compuesto de plástico o una membrana. Se describe que el tamiz (35) presenta un ancho de malla de 1 mm a 10 mm, adicionalmente de 2 mm a 5 mm, en particular de 3 mm.

30 En una forma de realización preferida adicional de la invención se prevé que la fracción de tamaños de partícula de la muestra recogida presente preferentemente un tamaño de 0,1 mm a 1,0 mm, más preferentemente de 0,1 mm a 0,7 mm, en particular preferentemente de 0,2 mm a 0,5 mm. De acuerdo con la invención, se prefiere que, en consecuencia, las partículas de la muestra recogida tengan un tamaño de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 o 1,0 mm.

Se describe que la unidad de separación (100) presenta una dimensión exterior de 10 cm a 100 cm, más preferentemente de 20 cm a 60 cm, en particular preferentemente de 40 cm.

35 Se describe adicionalmente que la unidad de succión (110) es un soplador de aire, que genera en el canal (20) una velocidad de la corriente de aire preferentemente de 40 a 60 m/s, en particular preferentemente de 58 m/s. Se describe adicionalmente que la unidad de succión (110) tiene una dimensión exterior de 10 cm a 100 cm, adicionalmente de 20 cm a 60 cm, en particular de 40 cm.

40 Se describe que la deposición de una fracción de partículas determinada en el ciclón se logra mediante el ajuste de una corriente de aire con una fuerza de succión determinada. Este ajuste se logra con la válvula de reducción. El control del ajuste de la corriente de succión se realiza con el manómetro. Se puede ajustar correspondientemente una corriente de aire con una fuerza de succión determinada por la presión establecida.

45 Se describe que el canal (20) es preferentemente de plástico. Otros materiales son polímeros, vidrio, metales o aleaciones metálicas. Además, se describe que el canal (20) tiene un diámetro de 1 cm a 5 cm, más preferentemente de 1,5 cm a 3,5 cm, en particular preferentemente de 2,5 cm. Además, se describe que el canal (20) tiene una longitud de 0,1 m a 5 m, adicionalmente de 0,1 m a 3 m, en particular de 0,1 m a 2 m. Se describe que el canal (20) está construido de tal manera en su extremo dirigido aguas abajo que se habilita que la mezcla de partículas/corriente de aire se insufla tangencialmente en una trayectoria circular en el ciclón (40).

50 Se describe que el ciclón (40) está compuesto de polietileno. Se describe adicionalmente que el ciclón (40) está compuesto de otros plásticos o polímeros, vidrio, metales o aleaciones metálicas. El ciclón (40) descrito tiene un diámetro de 1 cm a 25 cm, adicionalmente de 5 cm a 10 cm, en particular de 8 cm. En un ejemplo adicional, el ciclón (40) tiene una altura de 1 cm a 50 cm, más preferentemente de 1 cm a 30 cm, en particular de 20 cm.

Se describe que el recipiente (45) es un recipiente en el que se recogen muestras, es decir, un recipiente de recogida de muestras. En un ejemplo se describe que el recipiente (45) está conectado al ciclón (40) mediante una rosca. También se describen otras conexiones, tales como a través de un rectificado en el ciclón o en el recipiente, así como una abrazadera. Además, se describe que el recipiente (45) está compuesto de polietileno (PE). Además,

se describe que el recipiente (45) está compuesto de plástico, polímeros o vidrio. Se describe además que el recipiente (45) tiene un volumen de 5 ml a 500 ml, adicionalmente de 100 ml a 400 ml, en particular de 200 ml.

En un ejemplo adicional se describe que un agente de extracción está dispuesto en el recipiente (45). Posibles agentes de extracción son acetonitrilo, metanol o agua.

- 5 Se describen adicionalmente mezclas de dos o tres agentes de extracción diferentes. En otro ejemplo, se describe que los dos o tres agentes de extracción diferentes están presentes en diferentes proporciones entre sí en la mezcla.

10 En un ejemplo se usa una mezcla de acetonitrilo/agua como agente de extracción. En un ejemplo, la relación de mezcla de acetonitrilo/agua es de 80/20 v/v, adicionalmente de acetonitrilo/agua de 60/40 v/v, adicionalmente de acetonitrilo/agua de 50/50 v/v, adicionalmente de acetonitrilo/agua de 40/60 v/v, adicionalmente de acetonitrilo/agua de 20/80 v/v y adicionalmente agua pura.

En un ejemplo adicional se describe que el agente de extracción es acetonitrilo/metanol/agua. Se describe adicionalmente que el acetonitrilo/metanol/agua está en una relación de mezcla de 40/40/20 v/v/v.

Se describe que el agente de extracción puede ajustarse de manera correspondiente a la toxina que debe detectarse o al material que debe analizarse.

- 15 En un ejemplo adicional se describe que un dispositivo de análisis está conectado directamente al recipiente (45).

Además, de acuerdo con la invención, está previsto preferentemente que el dispositivo de análisis sea adecuado para la conducción de procedimientos cromatográficos, espectroscópicos o inmunológicos.

20 De acuerdo con la invención, se prevé preferentemente que el dispositivo de análisis sea adecuado para la conducción de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía líquida de rendimiento ultra-alto (UPLC), espectroscopía IR de transformada de Fourier (FTIR), resonancia magnética nuclear (*nuclear magnetic resonance*, RMN), análisis directo en tiempo real (DART) o inmunoensayo, en particular ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA).

25 En un ejemplo adicional se describe que el extremo aguas arriba del canal (50) se dirige perpendicularmente al interior del ciclón (40) en forma de un tubo de inmersión. Se describe que el canal (50) está compuesto de plástico. Además, se describe que el canal (50) tiene un diámetro de 1 cm a 5 cm, adicionalmente de 2 cm a 4 cm, en particular de 2,5 cm.

30 En un ejemplo adicional se describe que el filtro (55) es un filtro de fibra de vidrio. Se describe que el filtro (55) se encuentra en una frita de metal en un portafiltras. Se describe que el filtro (55) evita una contaminación de la unidad de succión (110). En un ejemplo se describe que el portafiltro tiene un diámetro de 1 cm a 20 cm, adicionalmente de 1 cm a 15 cm, en particular de 8 cm. Además, se describe que el filtro (55) tiene una altura de 1 cm a 20 cm, además de 1 cm a 15 cm, en particular de 8 cm.

En un ejemplo se describe que el canal (70) está compuesto de plástico. Además, se describe que el canal (70) tiene un diámetro de 1 cm a 5 cm, adicionalmente de 2 cm a 4 cm, en particular de 2,5 cm.

35 En un ejemplo se describe que el canal (60) es una manguera. En un ejemplo, el canal (60) es una manguera de goma.

En un ejemplo adicional se describe que la válvula (65) es una válvula de reducción. Se describe que la corriente de aire generada desde la unidad de succión (110) se regula a través de la válvula (65).

40 Se describe que el ciclón (40), el recipiente (45), el canal (50), el filtro (55), el canal (70), el manómetro (75), el extremo dirigido aguas abajo del canal (20) así como el extremo dirigido aguas arriba del canal (60) están dispuestos dentro de una cámara (10), que tiene una abertura (15) dirigida aguas arriba y una abertura (16) dirigida aguas abajo, en la que el extremo dirigido aguas abajo del canal (20) pasa a través la abertura (15) y el extremo dirigido aguas arriba del canal (60) pasa a través de la abertura (16). Se describe que la cámara (10) permite el transporte y estabilidad del dispositivo.

45 Se describe adicionalmente un procedimiento para extraer una muestra de partículas de material a granel mediante el dispositivo para la detección de una contaminación por micotoxinas como se ha descrito anteriormente, que comprende las etapas:

- 50 (a) poner en contacto la sonda (30) con partículas del material a granel,  
 (b) aspirar las partículas mediante la generación de una corriente de aire desde la unidad de succión (110) aguas arriba a través del ciclón (40) hasta la sonda (30) y  
 (c) recoger y extraer las partículas en el recipiente (45) dispuesto por debajo del ciclón (40), en el que la fracción de tamaño de partículas de la muestra recogida preferentemente tiene un tamaño de 0,1 mm a 1,0 mm.

Se describe que el tamaño de la muestra es de 0,1 mm a 0,7 mm y más preferentemente de 0,2 mm a 0,5 mm.

Se describe que las partículas en la etapa (a) se arremolinan moviendo el material a granel.

5 Se describe que con el dispositivo descrito y con el procedimiento no tiene lugar un contacto directo de la sonda al introducirla en el material a granel. Más bien, está previsto que el contacto solo se realice con partículas del material a granel. En este sentido, por el dispositivo así como por el procedimiento viene dada la posibilidad de extraer partículas ya en la carga o descarga del material a granel. Se describe que la puesta en contacto de la sonda con las partículas se logra mediante arremolinamiento usando una unidad de movilización, tal como un mezclador de tambor, un vibrador, un transportador vibratorio o una corriente de aire generada por un soplador.

10 Se describe el uso del dispositivo descrito para extraer una muestra representativa de material a granel para la detección de al menos una contaminación por micotoxinas, en el que la fracción de tamaño de partícula de la muestra recogida tiene preferentemente un tamaño de 0,1 mm a 1,0 mm.

Además, la fracción de tamaños de partícula de la muestra recogida tiene preferentemente un tamaño de 0,1 mm a 0,7 mm, más preferentemente de 0,2 mm a 0,5 mm.

Se describe adicionalmente que el uso se aplica para la detección de micotoxinas.

15 Las micotoxinas se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en ocratoxinas, aflatoxinas, alcaloides del cornezuelo, toxinas de *Fusarium*, tales como en particular preferentemente desoxinivalenol y zearalenona, toxinas de *Alternaria* y citrinina.

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos y las respectivas figuras.

La Figura 1 muestra una representación esquemática de un ejemplo del dispositivo.

20 La Figura 2 muestra la correlación de la concentración de desoxinivalenol (DON) [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] de muestras de partículas, que se han obtenido con el dispositivo, y muestras de control en trigo.

La Figura 3 muestra la correlación de la concentración de zearalenona (ZON) [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] de muestras de partículas, que se han obtenido con el dispositivo, y muestras de control en trigo.

La Figura 4 muestra la correlación de la concentración de desoxinivalenol (DON) [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] de muestras de partículas, que se han obtenido con el dispositivo, y muestras de control en maíz.

25 La Figura 5 muestra la correlación de la concentración de zearalenona (ZON) [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] de muestras de partículas, que se han obtenido con el dispositivo, y muestras de control en maíz.

La Figura 6 muestra la correlación de la concentración de ocratoxina A (OTA) [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ] de muestras de partículas, que se han obtenido con el dispositivo, y muestras de control en café.

30 **Ejemplo 1: extracción de una muestra representativa y sin destrucción de partículas de material a granel mediante un dispositivo**

35 Se introducen en un mezclador de tambor aproximadamente 5 kg de material a granel suelto (mercancía a granel de productos alimenticios) de trigo, café verde o nueces. El mezclador de tambor se opera con una velocidad de giro de 28 rpm. De este modo, las partículas se separan del material a granel y se arremolinan en el aire circundante. La sonda (30) del dispositivo, que se muestra en la Figura 1, se introduce en la unidad de movilización (130) dentro de la abertura (135). A partir del soplador de aire (110) se genera una corriente de aire, que ejerce una velocidad de 58,2 m/s en el tubo (20) dirigido aguas abajo desde la sonda (30). De ese modo, las partículas se aspiran y se dirigen desde la sonda (30) a través del tubo (20) a través del ciclón (40) hasta el recipiente de recogida de muestras (45) dispuesto debajo del ciclón (40). Por la configuración concreta del dispositivo, en particular del ciclón (40), se prevé que en particular se recojan partículas con un tamaño de 0,2 mm a 0,5 mm.

40 **Ejemplo 2: procedimiento de análisis para micotoxinas de productos alimenticios a granel**

2.1 Obtención de la muestra de partículas de acuerdo con la invención

A partir de aproximadamente 5 kg de productos alimenticios a granel (trigo, malta, maíz, café verde, nueces o material a granel similar) se obtienen partículas de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 con el dispositivo.

45 2.2 Preparación de muestras de la muestra de partículas de acuerdo con la invención recogida para determinar la concentración de micotoxinas

50 0,25-0,5 g de la muestra de partículas se mezclan con 10 ml de una mezcla de acetonitrilo/agua (80:20; v:v). Como patrones internos se suministran 200  $\mu\text{l}$  de una solución de zearalenona con una concentración de  $c = 5 \mu\text{g}/\text{ml}$  y 200  $\mu\text{l}$  de una solución de fusarenona X con una concentración de  $c = 20 \mu\text{g}/\text{ml}$ . La extracción se lleva a cabo durante 5 minutos en un baño ultrasónico al nivel más alto de potencia, así como durante 20 minutos en un agitador mecánico.

El extracto se filtra a través de un filtro de fibra de vidrio. Una alícuota del extracto se concentra a 60 °C en una corriente de nitrógeno y se recoge de nuevo en el eluyente de HPLC y se diluye a 1:5 con eluyentes de HPLC.

2.3 Homogeneización de las muestras de control para analítica convencional

2.3.1 Muestras molidas en seco (por ejemplo, cereal, como el trigo)

5 Después de que se haya obtenido la muestra de partículas de acuerdo con la invención como se describe en 2.1, el resto de los productos alimenticios a granel de aproximadamente 5 kg se retira del mezclador de tambor y se muele finamente de forma directa (tamaño de grano < 1 mm). Estas muestras representan los controles para las muestras de partículas obtenidas con el dispositivo.

10 2.3.2 Muestras molidas en húmedo (por ejemplo, café verde, nueces o similar, pero no trigo, que no es adecuado para la molienda en húmedo debido a la presencia de gluten, que de otro modo conduciría al desarrollo de grandes grumos de masa)

15 Después de que se haya obtenido la muestra de partículas de acuerdo con la invención como se describe en 2.1, el resto de los productos alimenticios a granel de aproximadamente 5 kg se retira del mezclador de tambor y se homogeneiza de acuerdo con el procedimiento de análisis oficial según § 64 LFBG L 00.00-111/1, análisis de alimentos mod. - procedimiento de preparación de muestras para la provisión de una muestra oficial, verificación cruzada y prueba para la determinación de la cantidad de micotoxinas en los alimentos - parte 1: - Procedimiento para la homogeneización en húmedo. Estas muestras representan los controles para las muestras de partículas obtenidas usando el dispositivo de acuerdo con la invención.

2.4 Preparación de muestra de la muestra de control para determinar la concentración de micotoxinas

20 Se mezclan 10 g de la muestra de control homogeneizada según 2.3.1 o 2.3.2 con 40 ml de una mezcla de acetonitrilo/agua (80:20; v:v) y se agitan durante 30 minutos a 175 rpm. El extracto se filtra a través de un filtro de fibra de vidrio. Se disuelve 1 ml del extracto filtrado con 2 ml de agua, se agita manualmente y se mide por HPLC-EM/EM.

25 2.5 Medición de los extractos de las muestras de partículas extraídas de acuerdo con la invención y de las muestras de control

La medición de los extractos se realiza por HPLC acoplada a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo. La fase estacionaria es una fase RP-18. Se usa un gradiente binario con eluyente A y B. El caudal es de 0,8 ml/min.

**Programa de gradiente:**

30 Eluyente A: agua/metanol (95 + 5; V + V), carbonato de amonio: 1 mmol/l, ácido fórmico 0,0025 %  
Eluyente B: metanol

| Tiempo (min) | Eluyente A % | Eluyente B % |
|--------------|--------------|--------------|
| 0,00         | 80           | 20           |
| 6,9          | 20           | 80           |
| 7,0          | 20           | 80           |
| 8,0          | 0            | 100          |
| 10,0         | 0            | 100          |
| 10,1         | 80           | 20           |
| 14,0         | 80           | 20           |

La detección se lleva a cabo tanto en el modo positivo (ocratoxina A, aflatoxina B1, T-2, HAT-2) como en el negativo (desoxinivalenol, zearalenona) usando el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo como forma especial de la HPLC-EM.

35 **Ejemplo 3: Análisis de las micotoxinas desoxinivalenol (DON) y zearalenona (ZON) en material a granel de trigo**

La obtención de las muestras de partículas de acuerdo con la invención se realiza según el Ejemplo 1. La medición y la determinación de la concentración de DON o ZON en las muestras de partículas de acuerdo con la invención así como en las muestras de control obtenidas convencionalmente se realizan de acuerdo con Ejemplo 2. Los resultados de la determinación de la concentración de DON o ZON como micotoxinas en las muestras de partículas

de acuerdo con la invención así como en las muestras de control se muestran en la siguiente Tabla 1:

Tabla 1:

| N.º de muestra | Desoxinivalenol (DON) |                    | Zearalenona (ZON)     |                    |
|----------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|
|                | Muestra de partículas | Muestra de control | Muestra de partículas | Muestra de control |
|                | µg/kg                 |                    | µg/kg                 |                    |
| <b>Trigo</b>   |                       |                    |                       |                    |
| <b>673517</b>  | 826,7                 | 100                | 326,7                 | 24                 |
| <b>673518</b>  | 1500                  | 290                | 1040                  | 23                 |
| <b>673519</b>  | 580                   | 100                | 414                   | 13                 |
| <b>673521</b>  | 2100                  | 330                | 732                   | 20                 |
| <b>673522</b>  | 1500                  | 200                | 412                   | 10                 |
| <b>674444</b>  | 950                   | 120                | 144,3                 | 10                 |
| <b>676177</b>  | 770                   | 140                | 64,9                  | 14                 |
| <b>675915</b>  | 460                   | 62                 | 17,4                  | 0,3                |
| <b>676398</b>  | 1100                  | 190                | 1180                  | 13                 |
| <b>677547</b>  | 4700                  | 650                | 4220                  | 110                |
| <b>678064</b>  | 17000                 | 1400               | 2710                  | 94                 |
| <b>682371</b>  | 470                   | 54                 | 79                    | 1                  |
| <b>687390</b>  | 260                   | 13                 | 19,8                  | 1                  |
| <b>687480</b>  | 4500                  | 410                | 2030                  | 48                 |
| <b>689724</b>  | 310                   | 15                 | 16,9                  | 0,1                |
| <b>718344</b>  | 842                   | 200                | 270                   | 13                 |

Los resultados de la determinación de la concentración se muestran en las Figuras 2 y 3. Sorprendentemente, los inventores pudieron demostrar que la detección de las micotoxinas en las muestras de partículas obtenidas por el dispositivo se correlaciona en un alto grado con los resultados de las muestras de control obtenidas del material global. La Figura 2 muestra una correlación de  $R^2 = 0,9525$  de la concentración de DON en las muestras de partículas de acuerdo con la invención y las muestras de control. Dado que una correlación perfecta se supondría a un valor de  $R^2 = 1$ , el valor de  $R^2 = 0,9525$  representa una correlación muy alta. En este sentido, la muestra de partículas de acuerdo con la invención representa una muestra muy representativa, que refleja en una cantidad fiable la concentración de DON como micotoxina en la muestra global. La Figura 3 muestra que la correlación de la concentración de ZON en trigo de las muestras de partículas de acuerdo con la invención con las muestras de control es  $R^2 = 0,9194$ . Por lo tanto, la muestra obtenida de acuerdo con la invención también es en una gran medida significativa a la vista de la concentración medida de la micotoxina ZON en la muestra de control.

#### 5 Ejemplo 4: Análisis de las micotoxinas desoxinivalenol (DON) y zearalenona (ZON) en materiales a granel de maíz

La obtención de las muestras de partículas de acuerdo con la invención se realiza según el Ejemplo 1. La medición y la determinación de la concentración de DON o ZON en las muestras de partículas de acuerdo con la invención así como en las muestras de control obtenidas convencionalmente se realizan de acuerdo con Ejemplo 2. Los resultados de la medición de las concentraciones de DON o ZON en las muestras de partículas de acuerdo con la invención y en las muestras de control obtenidas convencionalmente se muestran en la siguiente Tabla 2:

Tabla 2:

| Parámetro       | DON                   |                    | ZON                   |                    |
|-----------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|
|                 | Muestra de partículas | Muestra de control | Muestra de partículas | Muestra de control |
|                 | µg/kg                 |                    | µg/kg                 |                    |
| <b>Maíz</b>     |                       |                    |                       |                    |
| <b>684007</b>   | 110                   | 10                 | 9,73                  | 0,4                |
| <b>688723</b>   | 440                   | 14                 | 78,2                  | 2,5                |
| <b>688726</b>   | 410                   | 21                 | 44,4                  | 0,4                |
| <b>Mais_Lab</b> | 2000                  | 260                | 272                   | 27                 |
| <b>689723</b>   | 5100                  | 450                | 730                   | 32                 |
| <b>691361</b>   | 840                   | 61                 | 60,9                  | 1,2                |
| <b>692053</b>   | 150                   | 25                 | 9,1                   | 2,9                |
| <b>692054</b>   | 210                   | 35                 | 5,4                   | 3,1                |
| <b>692055</b>   | 605                   | 42                 | 22,1                  | 3,1                |

Los inventores pudieron demostrar sorprendentemente que también en el maíz como producto alimenticio a granel se da una alta correlación entre las muestras de partículas obtenidas de acuerdo con la invención y las muestras de control directamente molidas del material a granel de maíz con respecto a las concentraciones de DON o ZON. La Figura 4 muestra una correlación de  $R^2 = 0,957$  para la concentración de DON. Por lo tanto, la muestra obtenida por el dispositivo es altamente significativa y de este modo representativa, para determinar de ese modo la contaminación del maíz con la micotoxina DON de una manera fiable y fácil. Lo mismo también se aplica a la medición de la concentración de ZON. La Figura 5 muestra una alta correlación de  $R^2 = 0,8264$ . Por lo tanto, también se demuestra para la determinación de esta micotoxina ZON adicional que el dispositivo puede obtener una muestra que es fiable y representativa con respecto a su importancia. En comparación con las muestras que consumen tiempo y técnicamente complejas, que deben obtenerse mediante la homogeneización completa del material a granel, la muestra de partículas del material a granel obtenida de acuerdo con la invención representa una alternativa segura y que es técnicamente más fácil de gestionar, que además resulta en un claro ahorro de tiempo y costes y que presenta al mismo tiempo resultados comparables con respecto a la concentración de micotoxinas.

#### 15 Ejemplo 5: Análisis de la micotoxina ocratoxina A (OTA) en el material a granel de café

La obtención de las muestras de partículas de acuerdo con la invención se realiza según el Ejemplo 1. La medición y la determinación de la concentración de ocratoxina A (OTA) en las muestras de partículas de acuerdo con la invención así como en las muestras de control obtenidas convencionalmente se realiza de acuerdo con Ejemplo 2. Los resultados de la medición de las concentraciones de ocratoxina A (OTA) en las muestras de partículas de acuerdo con la invención y en las muestras de control obtenidas convencionalmente se muestran en la siguiente Tabla 3:

Tabla 3:

| N.º de muestra | Ocratoxina A          |                    |
|----------------|-----------------------|--------------------|
|                | Muestra de partículas | Muestra de control |
|                | µg/kg                 |                    |
| <b>Café</b>    |                       |                    |
| 683699         | 40,1                  | 1,2                |
| 683700         | 50,5                  | 2,0                |
| 684131         | 20,4                  | 1,7                |

ES 2 681 219 T3

(continuación)

| N.º de muestra | Ocratoxina A          |                    |
|----------------|-----------------------|--------------------|
|                | Muestra de partículas | Muestra de control |
|                | µg/kg                 |                    |
| 684132         | 25,7                  | 0,5                |
| 684970         | 24,4                  | 0,8                |
| 685794         | 22,3                  | 0,7                |
| 685795         | 15,1                  | 0,2                |
| 685796         | 10,8                  | 0,6                |
| 686195         | 16,1                  | 1,0                |
| kaffee_Lab     | 26,1                  | 0,0                |
| 686652         | 63,5                  | 2,0                |
| 686653         | 20,6                  | 0,3                |
| 687580         | 65,5                  | 4,0                |
| 687951         | 11,6                  | 1,0                |
| 687952         | 47,6                  | 1,9                |
| 687953         | 39,3                  | 1,8                |
| 687954         | 51,5                  | 1,8                |
| 688832         | 65,7                  | 5,3                |
| 689831         | 75,7                  | 3,2                |
| 688425         | 20,4                  | 1,1                |
| 690546         | 50,9                  | 2,3                |
| 690547         | 37,4                  | 0,0                |
| 690969         | 54,1                  | 1,1                |
| 690970         | 36,3                  | 1,9                |
| 694987         | 17,8                  | 0,0                |
| 694988         | 32,0                  | 0,0                |
| 694525         | 12,3                  | 0,0                |
| 701399         | 23,37                 | 0,70               |
| 706186         | 28,39                 | 0,00               |
| 706187         | 58,88                 | 2,40               |
| 706495         | 36,53                 | 0,60               |
| 706496         | 43,26                 | 0,70               |
| 707928         | 17,15                 | 0,00               |

(continuación)

| N.º de muestra | Ocratoxina A          |                    |
|----------------|-----------------------|--------------------|
|                | Muestra de partículas | Muestra de control |
|                | µg/kg                 |                    |
| 708735         | 16,56                 | 2,00               |
| 709169         | 30,87                 | 1,00               |
| 709710         | 19,10                 | 1,30               |
| 710087         | 25,83                 | 0,50               |
| 711828         | 35,83                 | 0,80               |
| 712250         | 22,37                 | 0,50               |
| 712249         | 35,82                 | 0,30               |
| 712639         | 38,35                 | 0,70               |

Los valores medidos de la Tabla 3 muestran una correlación entre la carga con ocratoxina A (OTA) en las muestras de partículas de acuerdo con la invención con las muestras de control. Esta correlación se muestra en la Figura 6. La correlación es  $R^2 = 0,5082$ . Este valor puede considerarse relativamente bajo. Una razón para ello es una baja contaminación global del café a granel analizado. Sin embargo, a partir de los datos es posible llegar a la conclusión de que una contaminación por OTA de la muestra de partículas de acuerdo con la invención de  $< 50 \mu\text{g/kg}$  significa una contaminación global de la muestra global con OTA de  $< 5 \mu\text{g/kg}$ .

5

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para la detección de al menos una contaminación por micotoxinas en material a granel, que comprende las etapas:
- 5 (a) extraer una muestra de partículas con un tamaño de partícula de 0,1 mm a 1,0 mm del material a granel;  
(b) analizar la muestra extraída;  
(c) detectar al menos una contaminación por micotoxinas mediante la determinación de la concentración de la contaminación por micotoxinas y  
(d) inferir la contaminación real por micotoxinas del material a granel correlacionando la concentración en la muestra determinada en la etapa (c) con aquella de una muestra global del material a granel.
- 10 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, presentando el tamaño de partícula de la muestra extraída un tamaño de 0,1 mm a 0,7 mm, más preferentemente de 0,2 mm a 0,5 mm.
3. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 o 2, realizándose el análisis mediante un dispositivo de análisis para la realización de procedimientos cromatográficos, espectroscópicos o inmunológicos.
- 15 4. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, realizándose el análisis mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía de rendimiento ultra-alto (UPLC), espectroscopía IR de transformada de Fourier (FTIR), espectroscopía de resonancia magnética nuclear (*nuclear magnetic resonance*, RMN), análisis directo en tiempo real (DART) o ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA).
- 20 5. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, estando seleccionadas las micotoxinas del grupo compuesto por ocratoxinas, aflatoxinas, alcaloides del cornezuelo, toxinas de *Fusarium*, tales como de forma particularmente preferente desoxinivalenol y zearalenona, toxinas de *Alternaria* y citrinina.
6. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, realizándose la determinación de la contaminación por micotoxinas en el material a granel con ayuda de una correlación con datos de control a partir de la concentración determinada en la muestra de partículas.

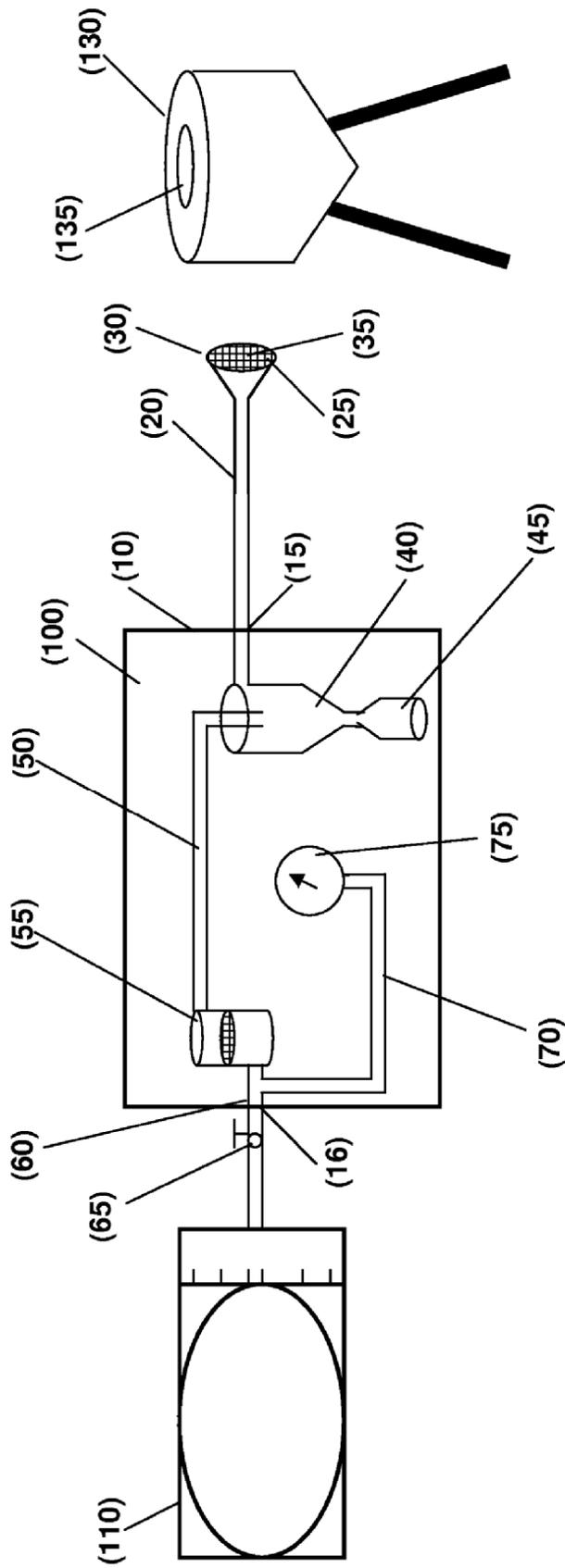


Figura 1

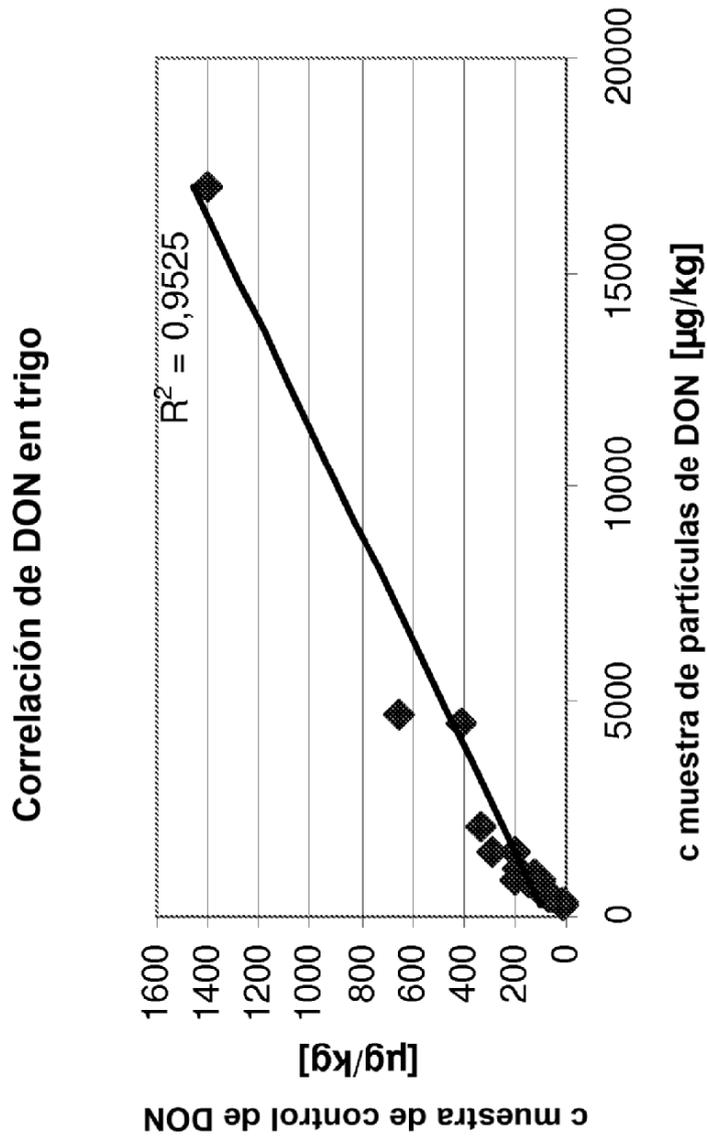


Figura 2

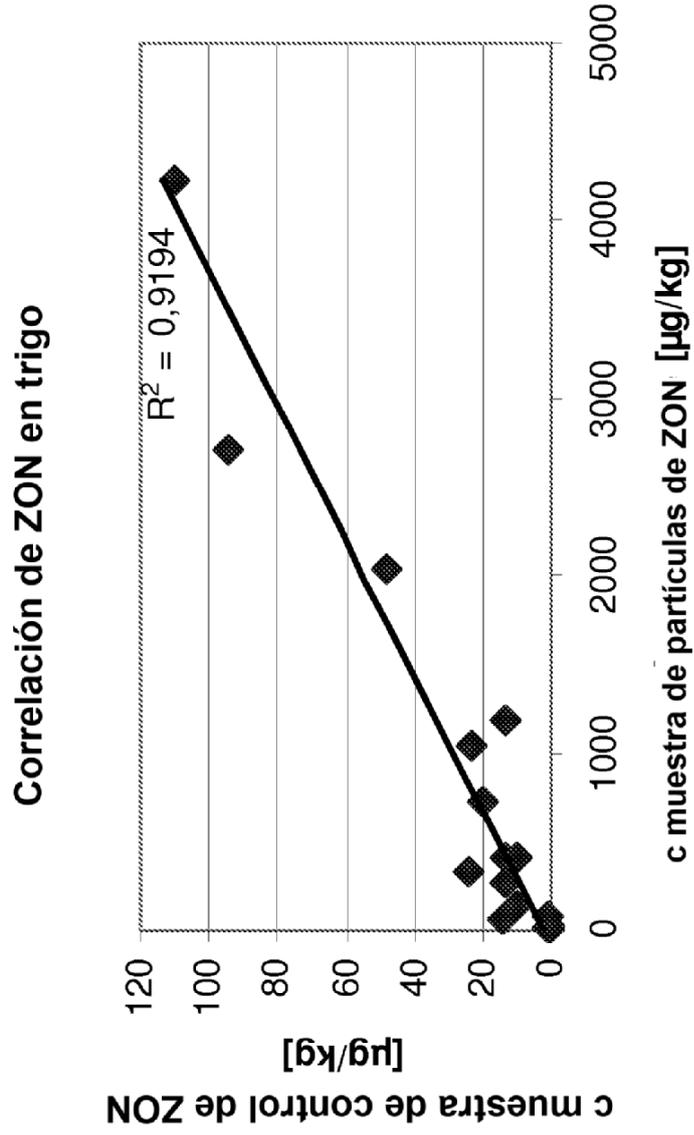


Figura 3

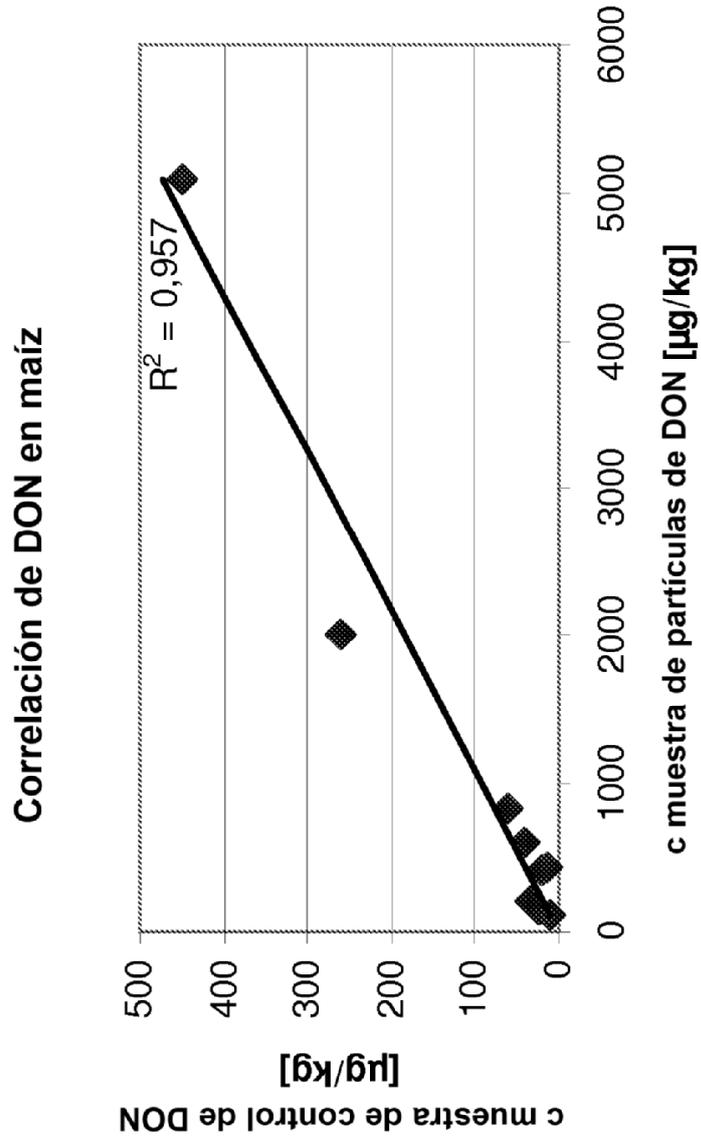


Figura 4

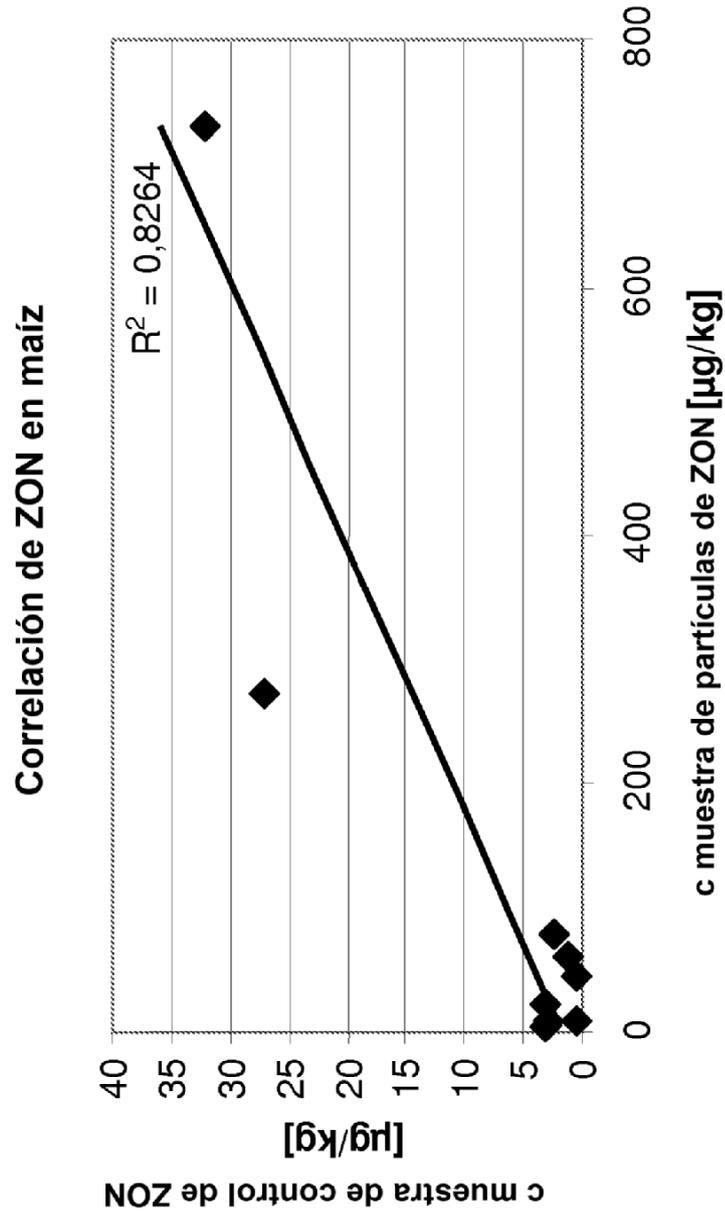


Figura 5

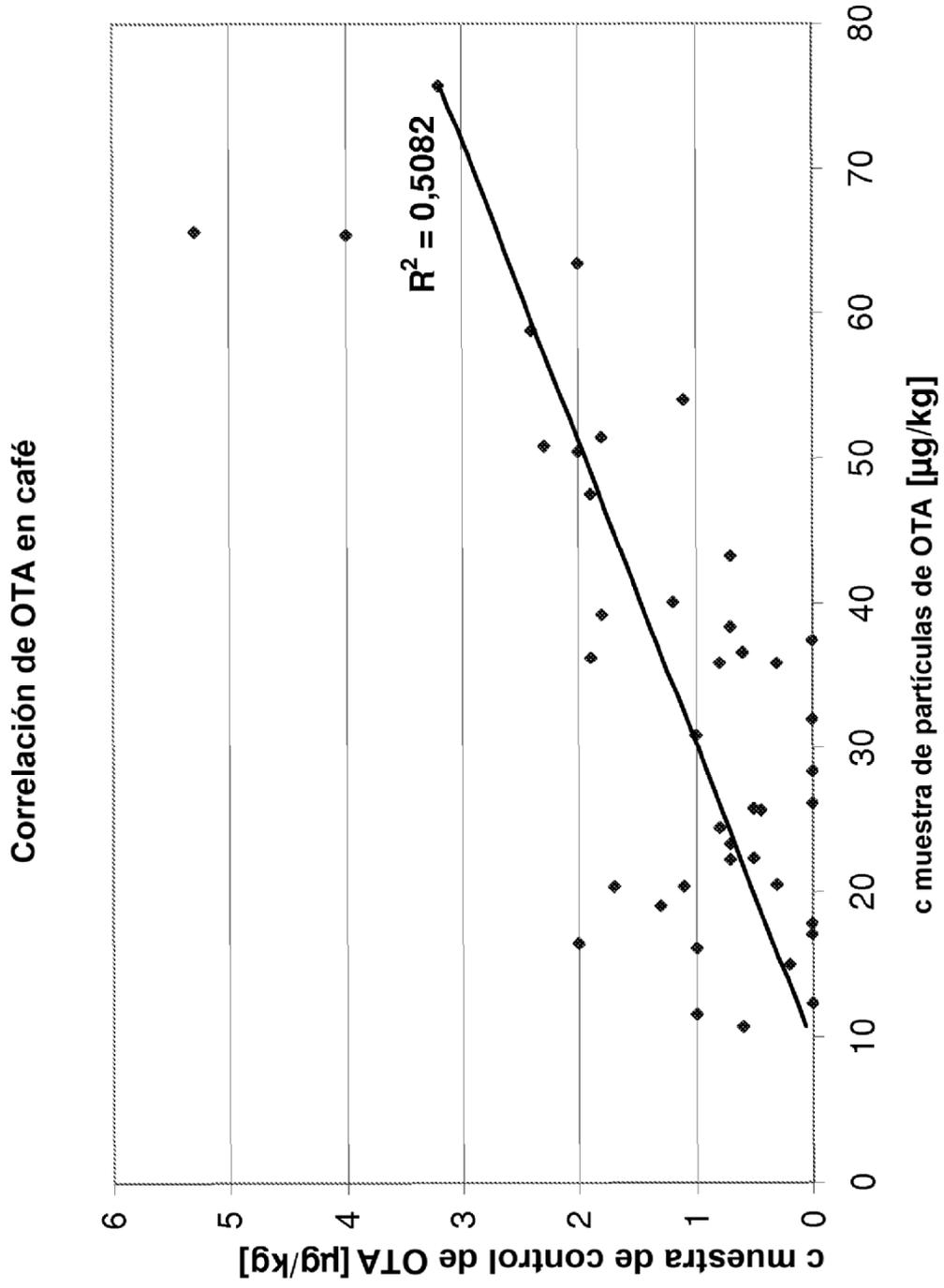


Figura 6