

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 686**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/10** (2006.01)

**A23L 5/20** (2006.01)

**G01N 33/02** (2006.01)

**G01N 1/40** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2016 E 16001588 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018 EP 3273236**

54 Título: **Método para la extracción de micotoxinas a partir de cereales, otros alimentos y piensos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.03.2019**

73 Titular/es:  
**R-BIOPHARM AKTIENGESELLSCHAFT (100.0%)  
An der Neuen Bergstr. 17  
64297 Darmstadt, DE**

72 Inventor/es:  
**WINKLE, JOHANNES (LUDWIG RUDOLF);  
BLÖDORN, DIRK;  
ZAID, KHOLOUD;  
LACORN, MARKUS y  
HEKTOR, THOMAS**

74 Agente/Representante:  
**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 703 686 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

Método para la extracción de micotoxinas a partir de cereales, otros alimentos y piensos

Campo de la invención

5 [0001] La invención se refiere a un método para la extracción de micotoxinas a partir de cereales y otros alimentos o de piensos y su cuantificación sucesiva. Campos de aplicación son la industria alimentaria, la industria del pienso o la biotecnología.

Fondo de la invención

10 [0002] Las micotoxinas son productos de metabolismo secundarios formados a partir de hongos tipo moho, que en animales vertebrados actúan de forma venenosa incluso en cantidades muy pequeñas. Actualmente se conocen aproximadamente 200 micotoxinas diferentes, que se forman a partir de 300 tipos de hongos diferentes. El concepto micotoxinas comprende una serie de compuestos químicos con diferente estructura y efecto, que se pueden resumir en los siguientes grupos de sustancias: aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos como por ejemplo deoxinivalenol, fumonisina, toxina Alternaria, toxina Fusarium, alcaloides de ergot.

15 [0003] Son de importancia particular en la industria alimentaria y del pienso las micotoxinas del grupo de aflatoxina, el grupo fumonisina, ocratoxina A, deoxinivalenol (DON), toxina HT-2 (abreviado HT2), toxina T-2 (abreviado T2) y zearalenona. A causa del alto potencial de riesgo y su amplia difusión, pueden perjudicar de forma crónica la salud de ser humano y animales incluso cantidades mínimas en alimentos y piensos. Por ello los legisladores han establecido en todo el mundo valores límite para las diferentes micotoxinas en diferentes matrices. Como un ejemplo se cita aquí la Directiva de la UE 1881 del año 2006. Además, a este respecto se fijaron exigencias mínimas en los sistemas de prueba (p.ej. ELISA) en la UE a través de la directiva 519 del año 2014. Existe por ello un interés particular en examinar alimentos o piensos en cuanto a una eventual carga de micotoxinas. Como problemático ha resultado en el pasado la circunstancia de que las micotoxinas mencionadas son muy heterogéneas en su estructura molecular y por ello poseen características muy diferentes como por ejemplo diferentes características de solución. Por ello, las aflatoxinas hidrófobas son insolubles en agua, mientras que por el contrario para la fumonisina y deoxinivalenol son hidrosolubles (Fig. 1). Por lo tanto, las aflatoxinas se tienen que extraer de una muestra usando mezclas de agua-metanol o agua-etanol. Las otras micotoxinas como p.ej. T2 y HT2 (Fig. 1) ocupan una posición intermedia en cuanto a su polaridad y capacidad de extracción, pero también necesitan disolventes como metanol para la extracción.

20

25

Estado de la técnica

30 [0004] La extracción de micotoxinas se ha realizado hasta ahora usando disolventes orgánicos como etanol, acetónitrilo o metanol. En todo caso se producen así grandes cantidades de disolventes orgánicos, que se deben eliminar a continuación. Como alternativa se desarrollaron métodos con los que se extrajeron determinadas micotoxinas por la adición de sustancias específicas como ciclodextrinas, componentes que contienen proteínas (p.ej. albúmina de suero bovino) o agente de solubilización (p.ej. tensioactivos no iónicos como tritón o brij). Tales métodos sin disolventes orgánicos se han patentado frecuentemente en los últimos años (US 2014/0356978; WO 2015/188205; WO 2016/057044). Sin embargo, en las extracciones sin disolventes orgánicos la extracción de ocratoxina o bien no se describe o requiere a causa de la función de carboxilo contenida en la molécula el uso de un tapón especial (Mishra et al., 2016, Food Add.Contam. 33: 500-508). Todavía no se ha descrito un método de extracción para todas las micotoxinas relevantes.

35

40 [0005] A causa de las desventajas citadas estos métodos no son medios de elección para analizar de forma rápida, sencilla, ecológica y económica alimentos como por ejemplo muestras de cereales, en cuanto a la presencia de las micotoxinas más variadas.

Objetivo y tarea de la invención

45 [0006] La invención tiene el objetivo de extraer de la forma más uniforme posible micotoxinas muy variadas (figura 1) con un único medio de extracción a partir de alimentos y piensos.

[0007] De esto se deduce la tarea de la presente invención de desarrollar un método de extracción con el que sea posible extraer de modo uniforme micotoxinas con diferentes características de solución.

[0008] Particularmente se deduce de aquí la tarea de extraer las micotoxinas aflatoxina, deoxivalenol, ocratoxina A, zearalenona, fumonisina y T2/HT2 de cereales (maíz, trigo, centeno, avena, cebada y sus parientes de la tribu triticeae), pienso, nueces, soja, gluten de maíz, y arroz pero también higos, dátiles, uvas pasas y pistachos y cuantificarlos a continuación.

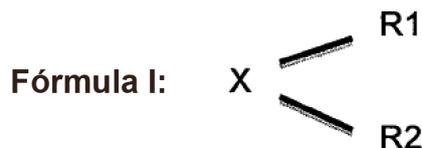
- 5 [0009] Esta tarea se resuelve a través de un método según la reivindicación 1. Otras posibles formas de realización resultan de las reivindicaciones secundarias, la descripción y los ejemplos.

Esencia de la invención

[0010] Sorprendentemente se descubrió que con ayuda de compuestos acuosos, taponados de naftil y/o fenilo o sus análogos heterocíclicos se pudieron extraer tanto micotoxinas hidrófobas como hidrófilas.

- 10 [0011] El método según la invención se caracteriza por el hecho de las soluciones taponadas de naftil y/o fenilo y/o sus análogos heterocíclicos, que soportan al menos un de grupo de ácido sulfónico o al menos un grupo de ácido orgánico, se ponen en contacto con los cereales u otros alimentos o piensos, la solución acuosa se separa a continuación y se determina el contenido de las micotoxinas extraídas en la solución acuosa.

- 15 [0012] Según la invención se usan compuestos de naftilo o fenilo o sus análogos heterocíclicos de la fórmula general I de forma individual o como mezcla, para extraer de forma particularmente efectiva micotoxinas de los grupos más diferentes.



en donde X, R1 y R2 tienen el siguiente significado:

X = resto de naftilO o fenilo o sus análogos heterocíclicos

- 20 R1 = al menos un grupo de ácido sulfónico o al menos un grupo de ácido orgánico

R2 = grupo no sustituido o un grupo funcional seleccionado a partir de hidroxilo, alquilo, alcoxi, amino, sulfhidrilo, alógeno y tioéter, que están dispuestos en la posición o, m o p del grupo de ácidos en la molécula, donde se excluyen los  $\alpha$ -aminoácidos.

[0013] A continuación se citan ejemplos, que están en posición de extraer micotoxinas de diferentes grupos:

- 25 ácido 1,5-naftildisulfónico

ácido 2,6- naftildisulfónico

ácido 4-hidroxifenilsulfónico

Ácido sulfónico de benceno,

ácido 4-metilbencenosulfónico,

- 30 ácido benceno-1,3-disulfónico,

ácido 1-naftol-3,6-disulfónico,

ácido 3-sulfobenzoico,

ácido 4-sulfobenzoico,

ácido 2-hidroxibenzoico,

ácido 2,6-dihidroxibenzoico,

ácido 2,5-dihidroxibenzoico,

5 ácido 2,4-dihidroxibenzoico,

ácido 3,4-dihidroxibenzoico,

ácido 3,5-dihidroxibenzoico

ácido 2-hidroxi-5-sulfobenzoico.

10 [0014] Particularmente ventajoso ha resultado el uso individual pero también de forma combinada de ácido 1,5-naftildisulfónico, ácido 2,6- naftildisulfónico y/o ácido p-hidroxifenilsulfónico.

[0015] El sobrenadante acuoso resultante que contiene las micotoxinas extraídas, se separa a continuación y se usa para la analítica. Así se puede realizar la determinación o la otra limpieza de las micotoxinas por ejemplo con ayuda de métodos enzimáticos, enzimoimmunológicos, métodos apoyados cromatográficamente y/o métodos cromatográficos con inmunoafinidad.

15 [0016] Para todos los ensayos descritos a continuación se usan materiales de referencia (Tabla 1). Para cada micotoxina se mide una muestra en blanco y una muestra de referencia contaminada.

Tabla 1. Materiales de referencia certificados de micotoxinas para la comprobación de la eficiencia de extracción del método reivindicado

Micotoxina (matriz)	valor de referencia*	Material certificado Designación**
Aflatoxina (Maíz)	n.d.	AC 215
	31. 2 ± 3,1 µg/kg	AC 295
ocratoxina (maíz)	n.d.	OC 853
	12. 3 ± 1,3 µg/kg	OC 866
Deoxinivalenol (trigo)	n.d.	DW 100
	2,1 ± 0,3 mg/kg	DW 174
Fumonisina (maíz)	n.d.	FC 400
	0,5 ± 0,07 mg/kg	FC 458
Zearalenona (maíz)	n.d.	ZC 300
	472,1 ± 65,6 µg/kg	ZC 321
T2/HT2 (Maíz)	n.d.	TC 978
	255,7 ± 18 µg/kg T2 y 681,1 ± 45,8 µg/kg HT2	TC 982
No detectado mediante HPLC; véanse los certificados de la compañía Trilogy para explicaciones más detalladas como p.ej. límite de detección del método utilizado		
** se usaron materiales de la empresa Trilogy (Washington, MO, USA)		

20 [0017] La invención se explica más detalladamente a continuación respecto a la detección de aflatoxina en maíz. El método de extracción de referencia prevé un peso de muestra de 1 g, que se extrajo con 5 mL 70% metanol en agua 10 min bajo agitación (véase la tabla 2). Después de la centrifugación o filtración el sobrenadante 1:7 se diluyó con agua destilada (p.ej. 100 µL de extracto + 600 µL de agua) y se cuantificó el contenido de aflatoxina en un ELISA comercial de uso común. Se usa el RIDASCREEN® Aflatoxin Total (Art. N° 4701, R-Biopharm AG, Darmstadt, véase también la tabla 2). Fundamento es la reacción de anticuerpo de antígeno. Las cavidades de las placas de microtítulo están recubiertas con anticuerpos de captura contra anticuerpos de anti-aflatoxina. Se añaden calibradores o solución de muestra extraída, aflatoxina marcada con enzimas (conjugado de enzimas) y anticuerpos de anti-aflatoxina. Aflatoxina libre y aflatoxina marcada con enzimas compiten por los sitios de enlace de anticuerpos de aflatoxina. Al mismo tiempo también se unen los anticuerpos de anti-aflatoxina a los anticuerpos de captura inmovilizados. La aflatoxina no ligada marcada con enzimas se elimina a continuación de nuevo en un

25

30

paso de lavado. La detección se realiza mediante la adición de una solución de sustrato/ cromógeno. El conjugado enzimático ligado transforma el cromógeno en un producto final azul. La adición del reactivo de detención conduce a un cambio de color de azul a amarillo.

La medición se realiza fotométricamente a 450 nm; la densidad óptica medida (OD) de la solución es inversamente proporcional a la concentración de aflatoxina en la muestra.

5

Tabla 2. Extracción de referencia usada y sistema ELISA usado para la comparación de la eficiencia de extracción del método reivindicado

Micotoxina (matriz)	extracción de referencia	ELISA
Aflatoxina (Maíz)	1 g de muestra + 5 mL 70% metanol en agua; dilución 1:7 con agua	R4701 (RIDASCREEN® Aflatoxina total)
Ocratoxina (maíz)	1 g de muestra + 5 mL 130 mM NaHCO <sub>3</sub> (pH 8.1); dilución 1:4 con agua	R1311 (RIDASCREEN® Ocratoxina A 30/15)
Deoxinivalenol (trigo)	1 g de muestra + 5 mL de agua; dilución 1:10 con agua	R5906 (RIDASCREEN® DON)
Fumonisinina (Maíz)	1 g de muestra + 5 mL 70% de metanol en agua; dilución 1:14 con agua	R3401 (RIDASCREEN® Fumonisinina)
Zearalenona (Maíz)	1 g de muestra + 5 mL 70% metanol en agua; dilución con tampón	R1401 (RIDASCREEN® Zearalenona)
T2/HT2 (Maíz)	1 g de muestra + 5 mL 70% metanol en agua; dilución 1:20 con agua	R3805 (RIDASCREEN® T2 / HT2 toxina)

10

[0018] A continuación se representa como ejemplo un método preferido para la extracción de aflatoxina a partir de maíz. Para ello una muestra de maíz de 1 g se tampona con 5 mL de una solución consistente en 250 mM de ácido 1,5-naftildisulfónico a un pH 8, se mezcla con 100 mM de Tris-(hidroximetil)-aminometano (Tris), se agita durante 10 min y se centrifuga o filtra. El sobrenadante claro se diluye 1:7 con agua destilada y se mide como se ha descrito ya anteriormente en ELISA.

15

[0019] Los resultados se representan en la tabla 3. Hay que tener en cuenta al mismo tiempo que por motivos de comparativa los resultados se indican como "reducción de señal en %". La reducción de señal resulta del formato competitivo del ELISA como sistema de prueba. Se debe valorar el producto de extracción en comparación entre el método nuevo reivindicado y la extracción de referencia establecida. Una concentración elevada de analito en el extracto (debido a un rendimiento de extracción alto) conduce a una reducción de la señal de medición (OD<sub>450 nm</sub>) la reducción de señal en [%] se calcula como sigue:

20

$$\text{Reducción de señal [\%]} = 100 - \left( \frac{\text{OD}_{\text{muestra positiva}}}{\text{OD}_{\text{muestra negativa}}} \times 100 \right)$$

Tabla 3: Producto de extracción de aflatoxina a partir de maíz usando la sustancia reivindicada ácido 1,5-naftildisulfónico (en tampones tris pH 8,0) en comparación con la extracción de referencia. Los valores OD se detectaron en RIDASCREEN® ELISA Aflatoxin Total.

25

	Extracción de referencia	250 mM 1,5-NDS + 100 mm Tris pH 8.0
OD <sub>Blanco</sub>	1,591	1,966
OD <sub>Positivo</sub>	0,474	0,525
Reducción de señal [%]	71	73

Si se comparan los valores de la extracción de referencia con los de la extracción reivindicada, entonces resulta claro que estos son muy similares. Por lo tanto, la aflatoxina se extrajo de modo cuantitativo con éxito del maíz matriz por el método reivindicado. Pequeñas diferencias en los valores OD sobre todo en las muestras en blanco se pueden explicar a través de efectos secundarios de las sustancias reivindicadas en el sistema de medición ELISA. Mediante las interacciones se trastorna levemente la competición entre aflatoxina del extracto (muestra) y conjugado de enzima-aflatoxina en puntos de enlace del anticuerpo. Esta es también la razón por la que no se han detectado valores de concentración, sino que los resultados se indican como "reducción de señal [%]". Esto crearía una imagen errónea porque influir en el ELISA no es parte de la extracción reivindicada. Los sistemas ELISA se

30

pueden ajustar correspondientemente a dichas sustancias, de modo que se proporciona la corrección del sistema de medición.

5 [0020] Independientemente del ejemplo dispuesto anteriormente sin embargo también es posible examinar otras muestras del ámbito de los alimentos o de los piensos como por ejemplo trigos, centeno, avena, cebada y sus parientes de la tribu Triticeae, piensos, nueces, soja, gluten de maíz y arroz. Además, son de interés los dátiles, las pasas y los pistachos.

10 [0021] Asimismo, la extracción no está limitada a las aflatoxinas citadas anteriormente. Así, también es posible extraer deoxinivalenol, ocratoxina A, zearalenona, fumonisina y T2/HT2 con el método según la invención. Asimismo pueden extraerse con el método según la invención otras toxinas como alcaloides de ergot, citrinina, y esterigmatocistina .

15 [0022] Las investigaciones han mostrado que se puede influir de forma positiva en la efectividad del método a través de un sistema tampón adecuado. Así, la solución acuosa de los compuestos de fenilo o de naftilo o sus análogos heterocíclicos pueden estar presentes taponados en el área de pH 5 - 10. En este caso, los tampones que contienen tris-(hidroximetil)-aminometano (Tris) e "Imidazol" se tienen que considerar preferiblemente en la zona de pH 7.5 - 8.5 (véase el ejemplo en la tabla 3). El tampón de "Imidazol" se aplicó mediante la mezcla de isopropilimidazol e hidrocloreuro de Imidazol en las proporciones correspondientes. Son igualmente posibles otros sistemas tampón como fosfato y EPPS (N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-(ácido 3- propanosulfónico), pero pueden presentar resultados de extracción diferentes dependiendo de la concentración y de la micotoxina.

20 [0023] Es posible también un método de extracción, en el que se usen compuestos de naftilo o de fenilo aromáticos, con al menos una posición sustituida con nitrógeno.

25 [0024] El método presenta frente a los métodos de extracción conocidos hasta ahora la ventaja de que todas las micotoxinas importantes se pueden extraer con un medio de extracción acuoso y ecológico de forma eficiente y a ser posible de forma completa de matrices relevantes de alimentos. El análisis de varias micotoxinas diferentes ya no exige, como en los métodos convencionales, pesos separados de muestras y medios de extracción individuales, sino únicamente un peso de muestra único y una extracción universal con el método reivindicado. De esta manera resulta para el usuario de este nuevo método un ahorro significativo de material y de tiempo, que lleva a una reducción de costes así como la prevención de una exposición a disolventes peligrosos para la salud de los medios de extracción de métodos convencionales.

[0025] La invención se explica más detalladamente a continuación con ejemplos de formas de realización.

30 Ejemplos de realización

Ejemplo 1

[0026]

35 Tabla 4: Producto de extracción de aflatoxina de maíz usando las sustancias reivindicadas ácido 1,5-naftildisulfónico (1,5-NDS, 250 mM) usando valores pH y tampones diferentes (100 mM) en comparación con la extracción de referencia (Ref., véase también la tabla 2). Los valores OD se detectaron con ELISA RIDASCREEN® Aflatoxin Total disponible comercialmente.

	Ref.	1,5-NDS Tris pH 8,0	1,5-NDS Tris pH 8,5	1,5-NDS Imidazol pH 8,0	1,5-NDS Imidazol pH 8,5
OD <sub>Blanco</sub>	1,591	1,966	1,917	1,684	1,578
OD <sub>Positivo</sub>	0,474	0,525	0,491	0,401	0,326
Reducción de señal [%]	71	73	74	76	79

Ejemplo 2

[0027] Tabla 5: Producto de extracción de aflatoxina de maíz usando las sustancias reivindicadas ácido 2,6-naftildisulfónico (2,6-NDS, 125 mM) usando valores pH y tampones diferentes (100 mM) en comparación con la

extracción de referencia (Ref., véase también la tabla 2). Los valores OD se detectaron con ELISA RIDASCREEN® Aflatoxin Total disponible comercialmente.

	Ref.	2,6-NDS pH 8,0	Tris	2,6-NDS pH 8,5	Tris	2,6-NDS Imidazol 8,0	pH	2,6-NDS Imidazol 8,5	pH
OD <sub>Blanco</sub>	1,505	1,686		1,711		1,654		1,645	
OD <sub>Positivo</sub>	0,377	0,435		0,356		0,403		0,393	
Reducción de señal [%]	75	74		79		76		76	

Ejemplo 3

[0028]

- 5 Tabla 6: Producto de extracción de DON a partir de trigo usando las sustancias reivindicadas ácido 1,5-naftildisulfónico (1,5-NDS, 250 mM) usando valores pH y tampones diferentes (100 mM) en comparación con la extracción de referencia (Ref., véase también la tabla 2). Los valores OD se detectaron con ELISA RIDASCREEN® Aflatoxin Total disponible comercialmente.

	Ref.	1,5-NDS pH 8,0	Tris	1,5-NDS pH 8,5	Tris	1,5-NDS Imidazol 8,0	pH	1,5-NDS Imidazol 8,5	pH
OD <sub>Blanco</sub>	2,440	2,682		2,722		2,649		2,638	
OD <sub>Positivo</sub>	0,738	0,795		0,842		0,744		0,811	
Reducción de señal [%]	70	70		69		72		69	

10 Ejemplo 4

[0029] Tabla 7: Producto de extracción de DON a partir de trigo usando las sustancias reivindicadas ácido 2,6-naftildisulfónico (2,6-NDS, 125 mM) usando valores pH y tampones diferentes (100 mM) en comparación con la extracción de referencia (Ref., véase también la tabla 2). Los valores OD se detectaron con ELISA RIDASCREEN® DON disponible comercialmente.

	Ref.	2,6-NDS pH 8,0	Tris	2,6-NDS pH 8,5	Tris	2,6-NDS Imidazol 8,0	pH	2,6-NDS Imidazol 8,5	pH
OD <sub>Blanco</sub>	2,463	2,694		2,667		2,610		2,657	
OD <sub>Positivo</sub>	0,886	0,923		0,923		0,871		0,906	
Reducción de señal [%]	64	66		65		67		66	

15 Ejemplo 5

[0030] Tabla 8: Producto de extracción de ocratoxina A a partir de maíz usando las sustancias reivindicadas ácido 1,5-naftildisulfónico (1,5-NDS, 250 mM) usando valores pH y tampones diferentes (100 mM) en comparación con la extracción de referencia (Ref., véase también la tabla 2). Los valores OD se detectaron con ELISA RIDASCREEN® A 30/15 disponible comercialmente.

	Ref.	1,5-NDS pH 8,0	Tris	1,5-NDS pH 8,5	Tris	1,5-NDS Imidazol 8,0	pH	1,5-NDS Imidazol 8,5	pH
OD <sub>Blanco</sub>	1,551	1,447		1,374		1,479		1,277	
OD <sub>Positivo</sub>	0,305	0,338		0,306		0,366		0,296	
Reducción de señal [%]	80	77		78		75		77	

20 Ejemplo 6

[0031]

Tabla 9: Producto de extracción de ocratoxina A a partir de maíz usando las sustancias reivindicadas ácido 2,6-naftildisulfónico (2,6-NDS, 125 mM) usando valores pH y tampones diferentes (100 mM) en comparación con la extracción de referencia (Ref., véase también la tabla 2). Los valores OD se detectaron con ELISA RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15 disponible comercialmente.

5

	Ref.	2,6-NDS pH 8,0	Tris	2,6-NDS pH 8,5	Tris	2,6-NDS Imidazol pH 8,0	2,6-NDS Imidazol pH 8,5
OD <sub>Blanco</sub>	1,551	1,602		1,462		1,425	1,374
OD <sub>Positivo</sub>	0,305	0,407		0,309		0,324	0,263
Reducción de señal [%]	80	75		79		77	81

Ejemplo 7

[0032]

Tabla 10: Producto de extracción de zearalenona a partir de maíz usando las sustancias reivindicadas ácido 1,5-naftildisulfónico (1,5-NDS, 250 mM) o ácido 2,6-naftildisulfónico usando valores pH y tampones diferentes (2,6-NDS-100 mM) en comparación con la extracción de referencia (Ref., véase también la tabla 2). Los valores OD se detectaron con ELISA RIDASCREEN® Zearalenon disponible comercialmente.

10

	Ref.	1,5-NDS pH 8,0	Tris	1,5-NDS Imidazol pH 8,5	Tris	2,6-NDS pH 8,0	Tris	2,6-NDS Imidazol pH 8,0
OD <sub>Blanco</sub>	3,093	2,594		2,540		2,403		2,214
OD <sub>Positivo</sub>	0,227	0,355		0,268		0,245		0,301
Reducción de señal [%]	93	86		89		90		86

15 Ejemplo 8

[0033]

Tabla 11: Producto de extracción de fumonisina a partir de maíz usando las sustancias reivindicadas ácido 1,5-naftildisulfónico (1,5-NDS, 250 mM) o ácido 2,6-naftildisulfónico usando valores pH y tampones diferentes (2,6-NDS-100 mM) en comparación con la extracción de referencia (Ref., véase también la tabla 2). Los valores OD se detectaron con ELISA RIDASCREEN® Fumonisin disponible comercialmente.

20

	Ref.	1,5-NDS pH 8,0	Tris	1,5-NDS Imidazol pH 8,0	Tris	2,6-NDS pH 8,0	Tris	2,6-NDS Imidazol pH 8,0
OD <sub>Blanco</sub>	1,193	0,719		0,762		0,874		0,881
OD <sub>Positivo</sub>	0,339	0,174		0,151		0,202		0,188
Reducción de señal [%]	72	76		80		77		79

Ejemplo 9

[0034]

Tabla 12: Producto de extracción de T2 y HT2 a partir de maíz usando las sustancias reivindicadas ácido 1,5-naftildisulfónico (1,5-NDS, 250 mM) o ácido 2,6-naftildisulfónico usando valores pH y tampones diferentes (2,6-NDS-100 mM) en comparación con la extracción de referencia (Ref., véase también la tabla 2). Los valores OD se detectaron con ELISA RIDASCREEN® T2/HT2 disponible comercialmente.

25

	Ref.	1,5-NDS Tris pH 8,0	1,5-NDS Imidazol pH 8,0	2,6-NDS Tris pH 8,0	2,6-NDS Imidazol pH 8,0
OD <sub>Blanco</sub>	1,676	0,947	0,921	0,868	0,799
OD <sub>Positivo</sub>	0,467	0,289	0,282	0,270	0,265
Reducción de señal [%]	72	69	69	69	67

Ejemplo 10

[0035]

5 Tabla 13: Producto de extracción de aflatoxina a partir de maíz usando las sustancias reivindicadas ácido 1,5-naftildisulfónico (1,5-NDS, 250 mM) o ácido 2,6-naftildisulfónico (2,6-NDS-100 mM) usando valores pH y tampones diferentes en comparación con la extracción de referencia (Ref., véase también la tabla 2). Los valores OD se detectaron con ELISA RIDASCREEN® Aflatoxin Total disponible comercialmente.

	Ref.	1,5-NDS fosfato 200 mm pH 8,0	1,5-NDS Epps* 100 mm pH 8,5	2,6-NDS fosfato 25 mm pH 8,0	2,6-NDS fosfato 75 mm pH 8,5
OD <sub>Blanco</sub>	1,487	1,542	1,607	1,474	1,445
OD <sub>Positivo</sub>	0,326	0,303	0,350	0,339	0,350
Reducción de señal [%]	78	80	78	77	76

\* (2-hidroxietil)-piperazina-N'-(ácido 3-propanosulfónico) Ejemplo 11

[0036]

10 Tabla 14: Producto de extracción de aflatoxina a partir de maíz usando las sustancias reivindicadas ácido 1,5-naftildisulfónico en diferentes concentraciones a pH 8.0 (5mM fosfato) en comparación con la extracción de referencia (Ref., véase también la tabla 2). Los valores OD se detectaron con ELISA RIDASCREEN® Aflatoxin Total disponible comercialmente.

	Ref.	300 mM	200 mM	100 mM	50 mM	10 mM
OD <sub>Blanco</sub>	1,320	1,516	1,611	1,601	1,596	1,601
OD <sub>Positivo</sub>	0,325	0,309	0,373	0,452	0,752	0,920
Reducción de señal [%]	75	80	77	72	53	43

Ejemplo 12

15

[0037]

20 Tabla 15: Producto de extracción de aflatoxina a partir de maíz usando la sustancia reivindicada ácido 1,5-naftildisulfónico en diferentes concentraciones a pH 8.0 (5mM fosfato) en comparación con la extracción de referencia (Ref., véase también la tabla 2). Los valores OD se detectaron con ELISA RIDASCREEN® Aflatoxin Total disponible comercialmente.

	Ref.	100 mM	75 mM	50 mM	10 mM	5 mM
OD <sub>Blanco</sub>	1,544	1,860	1,854	1,881	1,962	1,973
OD <sub>Positivo</sub>	0,438	0,489	0,521	0,620	1,101	1,051
Reducción de señal [%]	72	74	72	67	44	47

Ejemplo 13

25

[0038]

30 Tabla 16: Producto de extracción de deoxinivalenol, fumonisina y zearalenona (matrices véase la tabla 1) usando la sustancia reivindicada ácido 4-hidroxifenilsulfónico (375 mM; 4-OH-PSN) añadiendo 50 mM de fosfato (pH 8.0) en comparación con la extracción de referencia (Ref., véase también la tabla 2). Los valores-OD se detectaron con el ELISA disponible comercialmente de la serie RIDASCREEN® (véase la tabla 2).

	DON Ref.	DON 4-OH-PSN	Fumo* Ref.	Fumo* 4-OH-PSN	Zea* Ref.	Zea* 4-OH-PSN
OD <sub>Blanco</sub>	2,337	2,577	1,261	0,814	3,012	2,338
OD <sub>Positivo</sub>	0,786	0,824	0,398	0,195	0,195	0,294
Reducción de señal [%]	66	68	68	76	94	87

\*DON, deoxinivalenol; fumo, fumonisina; zea, zearalenona

5

Ejemplo 14

[0039]

10 Tabla 17: Producto de extracción de aflatoxina, ocratoxina y T2/HT2 (matrices véase la tabla 1) usando la sustancia reivindicada ácido de 4-hidroxifenilsulfónico (375 mM; 4-OH-PSN) añadiendo 50 mM de fosfato (pH 8.0) en comparación con la extracción de referencia (Ref., véase también la tabla 2). Los valores OD se detectaron con el ELISA disponible comercialmente de la serie RIDASCREEN® (véase la tabla 2).

	Afla* Ref.	Afla* 4-OH-PSN	OTA* Ref.	OTA* 4-OH-PSN	T2/HT2 Ref.	T2/HT2 4-OH-PSN
OD <sub>Blanco</sub>	1,701	1,821	1,551	1,557	1,889	0,965
OD <sub>Positivo</sub>	0,451	0,673	0,305	0,308	0,525	0,342
Reducción de señal [%]	73	63	80	80	72	65

\*Afla, aflatoxina; OTA, ocratoxina

Ejemplo 15

15 [0040]

Tabla 18: Producto de extracción de aflatoxina a partir de maíz usando la sustancia reivindicada ácido 4-hidroxifenilsulfónico en diferentes concentraciones a pH 8.0 (5mM fosfato) en comparación con la extracción de referencia (Ref., véase también la tabla 2). Los valores OD se detectaron con el ELISA disponible comercialmente de la serie RIDASCREEN® Aflatoxin Total (véase la tabla 2).

	Ref.	600 mM	500 mM	400 mM	300 mM	200 mM	100 mM
OD <sub>Blanco</sub>	1,485	1,692	1,707	1,712	1,722	1,692	1,649
OD <sub>Positivo</sub>	0,440	0,512	0,533	0,547	0,568	0,676	0,855
Reducción de señal [%]	70	70	69	68	67	60	48

20

Ejemplo 16

[0041]

25 Tabla 19: Producto de extracción de ocratoxina a partir de maíz usando la sustancia reivindicada ácido 4-hidroxifenilsulfónico en diferentes concentraciones a pH 8.0 (5mM fosfato) en comparación con la extracción de referencia (Ref., véase también la tabla 2). Los valores OD se detectaron con el ELISA disponible comercialmente RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15.

	Ref.	600 mM	500 mM	400 mM	300 mM	200 mM	50 mM
OD <sub>Blanco</sub>	1,620	1,308	1,365	1,345	1,383	1,475	1,692
OD <sub>Positivo</sub>	0,239	0,264	0,229	0,264	0,241	0,267	0,309
Reducción de señal [%]	85	80	83	80	83	82	82

30

Ejemplo 17

[0042]

5 Tabla 20: Producto de extracción de ocratoxina a partir de maíz con el uso combinado de las sustancias reivindicadas ácido 1,5-naftildisulfónico (1,5-NDS, 250 mM) y ácido 4-hidroxifenilsulfónico (diferentes concentraciones desde 10 mM hasta 150 mM) con pH 8,0 (5 mM fosfato) en comparación con la extracción de referencia (Ref., véase también la tabla 2). Los valores OD se detectaron con el ELISA disponible comercialmente RIDASCREEN® Ochratoxina A 30/15.

	Ref.	250 mM			1,5-NDS		
		150 mM	100 mM	75 mM	50 mM	20 mM	10 mM
OD <sub>Blanco</sub>	1,551	1,120	1,231	1,360	1,352	1,494	1,495
OD <sub>Positivo</sub>	0,305	0,330	0,375	0,321	0,355	0,422	0,485
Reducción de señal [%]	80	71	70	76	74	72	68

10

Ejemplo 18

[0043]

15 Tabla 21: Producto de extracción de ocratoxina a partir de maíz con el uso combinado de las sustancias reivindicadas ácido 1,5-naftildisulfónico (1,5-NDS, 250 mM) y ácido 4-hidroxifenilsulfónico (4-OH-PSN, 50 mM y 75 mM) con diferentes valores de pH 7,5 hasta 9,0 en comparación con la extracción de referencia (Ref., véase también la tabla 2). Los valores OD se detectaron con el ELISA disponible comercialmente RIDASCREEN® Ochratoxina A 30/15.

	250mM 1,5-NDS								
	Ref.	50 mM 4-OH-PSN				75 mM 4-OH-PSN			
		PH 7.5	pH 8.0	pH 8.5	pH 9.0	pH 7.5	pH 8.0	pH 8.5	pH 9.0
OD <sub>Blanco</sub>	1,551	1,342	1,249	1,210	1,265	1,244	1,223	1,139	1,108
OD <sub>Positivo</sub>	0,305	0,348	0,292	0,205	0,240	0,379	0,358	0,278	0,257
Reducción de señal [%]	80	74	77	83	81	70	71	76	77

20

Ejemplo 19

[0044]

25 Tabla 22: Producto de extracción de ocratoxina a partir de maíz con el uso combinado de las sustancias reivindicadas ácido 2,6-naftildisulfónico (125 mM) y ácido 4-hidroxifenilsulfónico (diferentes concentraciones de 20mM hasta 150 mM) con pH 8 (5mM fosfato) en comparación con la extracción de referencia (Ref., véase también la tabla 2). Los valores OD se detectaron con el ELISA disponible comercialmente RIDASCREEN® Ochratoxin A 30/15.

	Ref.	70mM	60mM	50mM	40mM	30mM	20mM
OD <sub>Blanco</sub>	1,952	1,213	1,421	1,457	1,474	1,555	1,647
OD <sub>Positivo</sub>	0,441	0,327	0,430	0,395	0,494	0,452	0,409
Reducción de señal [%]	77	73	70	73	67	71	75

30

Ejemplo 20

[0045]

35 Tabla 23: Producto de extracción de ocratoxina a partir de maíz con el uso combinado de las sustancias reivindicadas ácido 2,6-naftildisulfónico (2,6-NDS, 125 mM) y ácido 4-hidroxifenilsulfónico (4-OH-PSN, 50 mM y 75 mM) con diferentes valores de pH 7,5 hasta 9,0 en comparación con la extracción de referencia (Ref., véase también la tabla 2). Los valores OD se detectaron con el ELISA disponible comercialmente RIDASCREEN® Ochratoxina A 30/15.

	125 mM 2,6-NDS
--	----------------

## ES 2 703 686 T3

	Ref.	50 mM 4-OH-PSN				75 mM 4-OH-PSN			
		PH 7.5	pH 8.0	pH 8.5	pH 9.0	pH 7.5	pH 8.0	pH 8.5	pH 9.0
OD <sub>Blanco</sub>	1,986	1,698	1,608	1,558	1,477	1,562	1,479	1,405	1,416
OD <sub>Positivo</sub>	0,484	0,408	0,292	0,358	0,266	0,424	0,342	0,281	0,329
Reducción de señal [%]	76	76	82	77	82	73	77	80	77

Leyenda de las figuras

[0046]

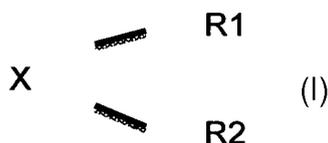
5

Figura 1:

Lista de micotoxinas relevantes en la industria alimentaria y del pienso. Junto a la lista están también representadas sus fórmulas químicas estructurales y sus características de solubilidad en un ambiente acuoso.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para la extracción de micotoxinas de cereales y otros alimentos o piensos, **caracterizado por el hecho de que** se ponen en contacto soluciones acuosas tamponadas de compuestos de naftilo y/o fenilo y/o sus análogos heterocíclicos con los cereales u otros alimentos o piensos, la solución acuosa se separa a continuación y se determina el contenido de las micotoxinas extraídas en la solución acuosa y donde como compuestos de naftilo y/o fenilo y/o sus análogos heterocíclicos se usan compuestos de la fórmula general I



15 en donde X, R1 y R2 tienen el siguiente significado:

X = radical de fenilo o de naftilo o sus análogos heterocíclicos

R1 = al menos un grupo de ácido sulfónico o al menos un grupo de ácido carbónico

R2 = no sustituido o seleccionado de un grupo funcional de hidroxilo, alquilo, alcoxi, amino, sulfhidrilo, halógeno y tioéter, que están dispuestos en la posición o, m o p al grupo ácido en la molécula.

- 20 2. Método según la reivindicación 1, **caracterizado por el hecho de que** se usan uno o varios de los compuestos de naftilo y/o fenilo y/o sus análogos heterocíclicos.
- 25 3. Método según una de las reivindicaciones 1-2, **caracterizado por el hecho de que** se usan compuestos con X = naftilo, R1 = ácido sulfónico o X = fenilo, R1 = ácido sulfónico y R2 = hidroxilo.
- 30 4. Método según una de las reivindicaciones 1-3, **caracterizado por el hecho de que** se usa ácido 1,5-naftildisulfónico, ácido 2,6-naftildisulfónico y/o ácido hidroxifenilsulfónico.
- 35 5. Método según una de las reivindicaciones 1-4, **caracterizado por el hecho de que** los compuestos de naftilo y/o fenilo y/o sus análogos heterocíclicos se usan en concentraciones de 5 hasta 600 mM dependiendo de su máxima solubilidad.
6. Método según una de las reivindicaciones 1-5, **caracterizado por el hecho de que** los compuestos de naftilo y/o fenilo y/o sus análogos heterocíclicos se aplican como solución, en polvo o en forma de pastillas.
7. Método según una de las reivindicaciones 1-6, **caracterizado por el hecho de que** la solución acuosa de compuestos de naftilo y/o fenilo y/o sus análogos heterocíclicos están tamponados en el área de pH 5 - 10.
- 40 8. Método según una de las reivindicaciones 1-7, **caracterizado por el hecho de que** el contenido de micotoxinas extraídas se determina en sistemas apoyados en anticuerpos como p.ej. ELISA o sistemas de flujo lateral.
9. Método según una de las reivindicaciones 1-8, **caracterizado por el hecho de que** el contenido de micotoxinas extraídas se determina en sistemas apoyados cromatográficamente.
10. Método según una de las reivindicaciones 1-9, **caracterizado por el hecho de que** las micotoxinas son objeto de otra limpieza usando columnas de cromatografía por inmunoafinidad.
- 45 11. Uso del método según una de las reivindicaciones 1-10 para la eliminación de aflatoxina B1, aflatoxina B2, aflatoxina G1, aflatoxina G2, aflatoxina M1, aflatoxina M2, fumonisina B1, fumonisina B2, fumonisina B3, deoxinivalenol, ocratoxina A, zearalenona, T-2, HT-2, citrinina, esterigmatocisteína y alcaloides de ergot.

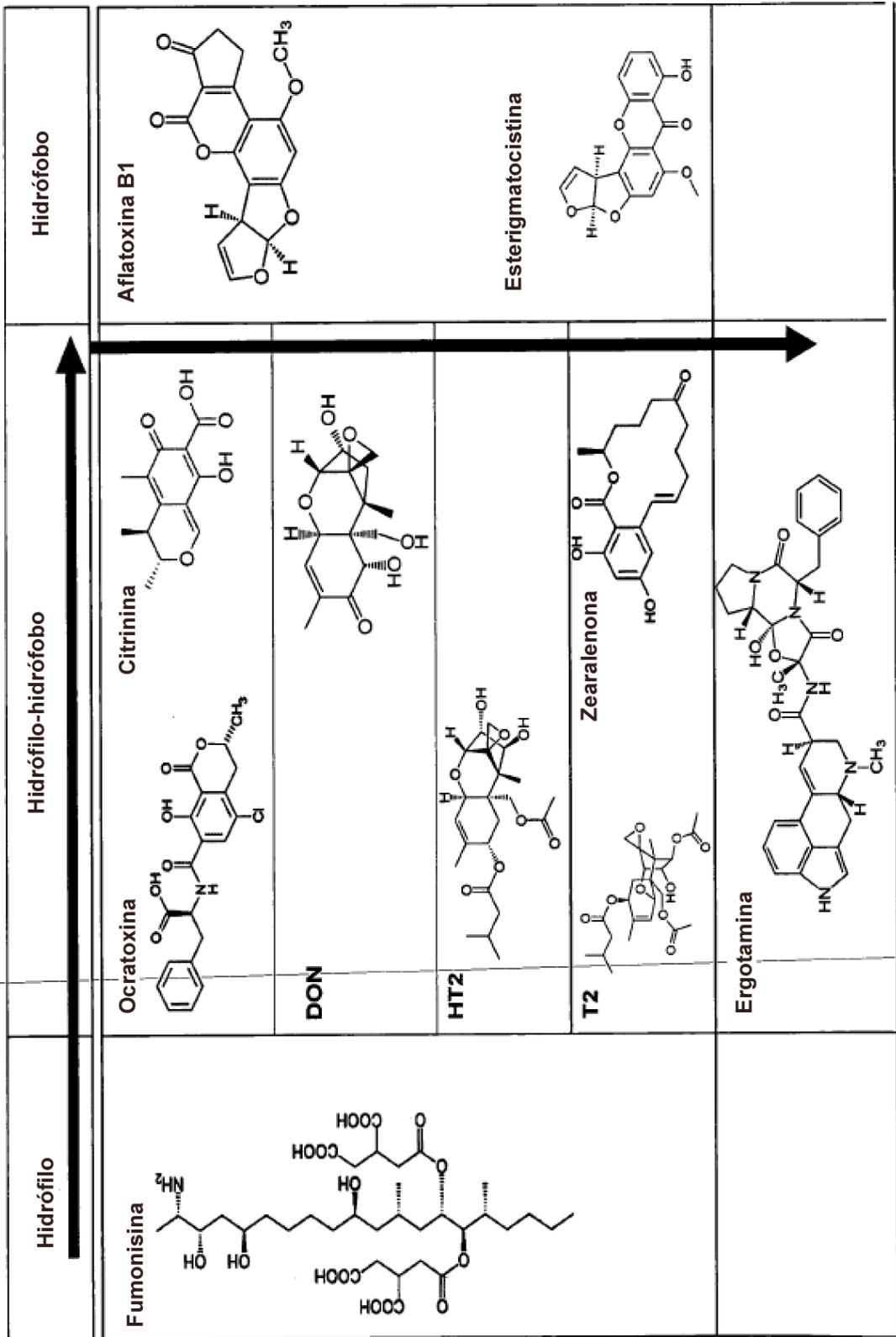


Figura 1