

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 137**

21 Número de solicitud: 201830387

51 Int. Cl.:

G01N 30/90 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

20.04.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

22.10.2019

Fecha de concesión:

25.02.2020

45 Fecha de publicación de la concesión:

03.03.2020

73 Titular/es:

**CUTRINA SABORIT, Florenci (100.0%)
C/ LA CARATULA, 1 ESC, 5, 7ªA
03202 ELCHE (Alicante) ES**

72 Inventor/es:

CUTRINA SABORIT, Florenci

74 Agente/Representante:

PAZ ESPUCHE, Alberto

54 Título: **Kit de detección de lactosa y procedimiento de detección mediante aplicación del mismo**

57 Resumen:

Kit de detección de lactosa, en superficies, aguas y alimentos, que comprende una solución de extracción; una solución de separación (17); una tira de separación (19) de la lactosa mediante cromatografía, con una primera línea (20) de colocación de la muestra, y una segunda línea (21) de fin de subida de la solución; una primera y una segunda soluciones de visualización; un pulverizador y; un patrón de lactosa.

Procedimiento de detección de lactosa, que comprende obtención y homogeneización (1) de muestra; introducción (7) de solución de separación (17) en cámara; colocación (8) de 5 {mi} del filtrado en una tira de separación (19); colocación (9) de 5 {mi} del patrón de lactosa; primer secado (10); introducción (11) de tira de separación (19) en cámara; segundo secado (12); introducción (13) soluciones de visualización en pulverizador; pulverización (14) de la tira de separación (19); revelado (15); e interpretación (16) de los resultados.

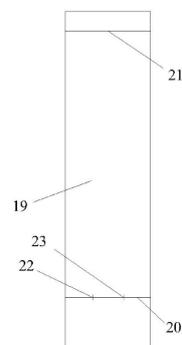


Fig. 1

ES 2 728 137 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

Kit de detección de lactosa y procedimiento de detección mediante aplicación del mismo

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención corresponde al campo técnico de los test de detección de lactosa, en concreto a un kit de detección en superficies, aguas y alimentos y, el procedimiento de realización del mismo.

10

Antecedentes de la Invención

La lactosa es un azúcar formado por la unión de una molécula de glucosa y otra de galactosa. Se encuentra presente, en distintas proporciones, en todas las leches de los mamíferos (vaca, cabra, oveja) y, por tanto, en muchos alimentos preparados, derivados y aditivos.

15

La intolerancia a la lactosa es un trastorno digestivo causado por la deficiencia en el intestino delgado de una enzima denominada lactasa, que es la encargada del desdoblamiento de la lactosa en los dos azúcares simples que la componen. Cuando no se produce esta conversión se genera una malabsorción de la lactosa, provocando diversos síntomas como dolor abdominal, distensión, diarrea, estreñimiento y/o vómitos.

20

Las personas diagnosticadas con intolerancia a la lactosa deben seguir una dieta libre de lactosa o de bajo contenido en lactosa (en función del grado de intolerancia), motivo por el cual y, en base al dictamen científico de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), sobre los contenidos máximos de lactosa en la intolerancia a la lactosa y la galactosemia, la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) ha adoptado orientaciones de contenido en lactosa para las denominaciones "Sin Lactosa" (Productos con un contenido inferior de lactosa del 0,01%) y "Bajo contenido en lactosa" (Productos con un contenido inferior de lactosa del 1%).

30

En la actualidad por tanto, existe una necesidad de comprobación de los niveles de contenido en lactosa, tanto para los alimentos como para las superficies en los que se trata los mismos y las aguas de limpieza de dichas superficies.

35

Estas comprobaciones deben resultar lo más rápidas posible, para entorpecer lo mínimo el proceso productivo y, no deben resultar muy costosas, para que el precio no resulte un impedimento en la realización de estas comprobaciones por parte de las empresas.

- 5 En el estado de la técnica existen kits que permiten detectar proteínas de la leche a través de métodos relativamente rápidos como ELISA. Esta gran familia de análisis está relacionada con mostrar la contaminación de productos que contienen leche, pero no tiene nada que ver con la detección de lactosa, pues en estos kits se busca evitar una reacción alérgica respecto a las proteínas de la leche, que pueden estar presentes en productos con
10 o sin lactosa, mientras que en la detección de la lactosa se busca evitar los síntomas consecuencia de la intolerancia a este azúcar compuesto.

Existen distintas alternativas en el mercado respecto a la detección de lactosa en superficies, aguas y alimentos, como por ejemplo los biosensores y el método enzimático.

15

Así pues, la detección de lactosa mediante biosensores resulta fácil de usar y consigue la especificidad de detección de la lactosa respecto a otros azúcares que puede tener la muestra. No obstante, presenta como inconvenientes principales el precio de los equipos y consumibles y el límite de detección, que se sitúa por encima de las 100 ppm que es el
20 límite actualmente fijado por la legislación.

Por otra parte, el método enzimático se basa en la rotura enzimática de la lactosa para analizar uno de los dos azúcares que la forman, la galactosa. Es un método eficaz para la cuantificación exacta de la cantidad de lactosa que tiene una muestra, no obstante presenta
25 dificultad en la manipulación, en los ajustes de calibración, en las limitaciones que supone el trabajo con enzimas (hay que conservar a temperaturas de congelación y refrigeración) y en la necesidad de disponer de un espectrofotómetro, que presenta un precio elevado que no pueden permitirse todas las empresas.

- 30 Pueden mencionarse los siguientes documentos del estado de la técnica RU2396560C1, CN106706798A, CN107315053A, CN10523216A, CN107462660A, CN106645132A, JP2008170428A, JPS5651663A y ES2361733.

El documento de referencia RU2396560C1, define un método de identificación de hidratos
35 de carbono, que implica la determinación del contenido de glucosa, lactosa, galactosa, fructosa y tagatosa a través de cromatografía en capa fina en placas Sordfil.

Las placas se pre-saturan con una solución de dihidrofosfato de sodio (NaH_2PO_4) 0,5 mol/dm³ y luego se secan. A continuación, se usa una microjeringa para recoger 0,001 cm³ de solución de carbohidrato que luego se deposita en la línea de partida en la placa cromatográfica, se seca en aire y se baja a un disolvente. El disolvente utilizado es una mezcla de acetona, alcohol isopropílico y una solución de ácido láctico. La separación cromatográfica tarda de 80 a 90 minutos. Cuando el solvente alcanza el límite de elución, la placa se seca nuevamente a temperatura ambiente hasta la evaporación completa del solvente.

10

En este documento, se utilizan dos ejemplos para demostrar que el método propuesto es mejor que otro método de cromatografía, pero la comparación la realizan con distintas condiciones, pues para la comprobación del método anterior utilizan una matriz alimentaria real, en concreto un yogurt, a la que aplican un proceso de cromatografía de capa fina con distintos reactivos de impregnación de placa, solventes, solución de revelado..., mientras que en la comprobación del método propuesto en el documento utilizan una mezcla pura de laboratorio de distintos carbohidratos. De este modo, no se está realizando ambos métodos con igualdad de condiciones, dado que el comportamiento de una matriz real no es el mismo que el de una matriz de laboratorio, pues existen múltiples componentes en la matriz que pueden influir en el resultado final.

20

Además, en este documento se pretende identificar la presencia de carbohidratos en una muestra, pero en ningún momento se determina el límite de detección del método. Es decir, no se indica cuál es el valor mínimo de las sustancias que es posible detectar con este método, de manera que en caso de no detectarse la lactosa, puede ser que no exista en la muestra o bien que exista en una cantidad que no resulta detectada por este método y sin embargo se encuentre por encima de las 100ppm en la muestra inicial. Es por tanto un procedimiento que no permite la detección de presencia o ausencia de los carbohidratos en una concentración determinada, por lo que no resulta válido para el objeto de esta invención, que es poder determinar que la cantidad de lactosa de una muestra es inferior o superior al valor mínimo permitido para poder considerar un alimento "sin lactosa" o "con bajo contenido en lactosa".

25

30

Así mismo, un dato extraído del documento, como es la cantidad de muestra utilizada de 1 microlitros, indica que está trabajando con concentraciones de carbohidratos superiores a las 100ppm que actualmente marcan el límite en la legislación.

35

Además, al tratar de separar todos los carbohidratos, la longitud que recorre la muestra en las tiras de visualización es elevada, suponiendo tiempos que oscilan entre 80 y 90 minutos, excesivos en la práctica, pues reducen la productividad.

5

En este método además dado que se presenta para mezclas ideales de laboratorio, no propone un pretratamiento de la muestra consistente en la extracción de la lactosa de la muestra por disolución, mediante precipitación de proteínas y péptidos. Resulta además un método que se dilata excesivamente en el tiempo, debido al secado a temperatura ambiente. Esto además resta estandarización al método, dado que cada analista puede considerar una placa seca tras un tiempo distinto de secado.

10

Otro inconveniente es que utiliza reactivos de manipulación complicada, por ser corrosivos, cancerígenos o nocivos. Además, se adapta más a un método de laboratorio en el que hay que ajustar parámetros, impregnar placas... y no a un kit rápido que pueda utilizarse por cualquier empresa, en laboratorios sin grandes requisitos de instalaciones y maquinaria, para conocer estos parámetros de un modo rápido y sencillo.

15

El documento de referencia CN106706798A define un método para determinar el contenido de lactosa que implica disolver la muestra que se va a medir en agua desionizada por ultrasonidos para obtener una solución mixta que se transfiere a un matraz volumétrico y se centrifuga. Se repite el proceso de disolución y transferencia y se reemplaza la muestra con un estándar de lactosa para obtener una solución estándar, utilizando cromatografía líquida para obtener el tiempo de retención y área pico de cada sustancia.

20

25

La cromatografía líquida para la separación de los carbohidratos se muestra efectiva para un amplio rango de muestras, sin embargo existen limitaciones importantes para darle uso en la industria alimentaria. Por un lado el nivel de aparatos/maquinaria necesarios para llevarla a cabo (aplicación de ultrasonidos, ordenador dedicado, columna de cromatografía, centrífuga, etc...), suponen un gran inconveniente dado que más de un 90% del tejido empresarial alimentario son pequeñas y medianas empresas y muy pocas pueden permitirse el uso de este tipo de técnicas. Por otro lado el nivel técnico del personal requerido para poder llevar a cabo esta técnica, una vez más la mayoría de empresas no se lo pueden permitir. Y por último, se precisa un elevado número de muestras a analizar para que un laboratorio pudiera plantearse establecer una técnica de este tipo.

30

35

Esta patente, además, está orientada a detectar lactosa en alimentación animal (principalmente a lechones), siendo los límites de sensibilidad completamente distintos que en alimentación humana. El pretratamiento que debe realizarse a la muestra, mediante ultrasonidos, centrifuga... complica el instrumental.

5

El documento de referencia CN107315053A, define un método de análisis de nuevo mediante cromatografía líquida para detectar la cantidad apropiada de galactosa, glucosa, lactulosa, sacarosa y estándar de referencia de lactosa.

10 Presenta por tanto las mismas limitaciones técnicas, de personal, etc..., que el documento anterior. Aunque en este caso el documento plantea un sistema de atomización para la detección de sustancias al final de la cromatografía líquida y está enfocado al control de la calidad de la lactosa y la investigación de sustancias relacionadas.

15 El documento de referencia CN105723216A, determina un método de detección y cuantificación de galacto-oligosacáridos en una muestra que implica hacer reaccionar una muestra que comprende galacto-oligosacáridos y dextrina con reactivo de derivatización, derivatizar dextrina y galacto-oligosacáridos en la muestra y separar el componente galacto-oligosacárido en la muestra por cromatografía líquida de alta resolución usando fase reversa
20 30C columna de cromatografía.

De nuevo el método presenta las mismas limitaciones técnicas, de personal, etc... y en este caso aún más debido a que se utiliza HPLC, que es una técnica aún más avanzada que la cromatografía líquida, LC). Esta patente busca la detección de dos compuestos (galacto-oligosacáridos) distintos a la lactosa, aunque uno es un derivado de la misma.
25

El documento de referencia CN107462660A, plantea una cromatografía de intercambio iónico que presenta las mismas limitaciones que en los casos anteriores. Este documento se centra en la detección de galacto-oligosacáridos en alimentos para niños y leche en polvo.
30

El documento de referencia CN106645132A utiliza un método enzimático que descompone la lactosa en sus monosacáridos para medir la galactosa por método cromogénico (con una serie de reactivos se consigue que la presencia de galactosa dé color). Está completamente orientado a muestras humanas y se trata de un tipo de métodos que suelen ser totalmente
35 cualitativos, es decir que valoran la presencia/ausencia, pero resulta difícil hacer un ajuste de cambio de color para valorar la existencia de una concentración determinada.

El documento de referencia JP2008170428A realiza una mejora de la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia para la detección de trazas de azúcares y alcoholes derivados de los mismos. La mejora consiste en introducir un detector UV al final de la columna de cromatografía y benzoilar los azúcares/alcoholes para que absorban en UV (por sí solos no lo hacen). Presenta las mismas limitaciones técnicas, personal, etc... que en los documentos anteriores.

El documento de referencia JPS5651663A se refiere a un método para analizar azúcares, cualitativa y cuantitativamente mediante cromatografía de capa fina o de papel, principalmente en muestras humanas (aunque también nombra los alimentos) y la aplicación de rayos ultravioleta tras la pulverización de la disolución. Resulta un método que no está planteado como un kit rápido de análisis y de fácil uso para gente que no tenga expresamente una elevada experiencia en cromatografía de capa fina.

Finalmente, el documento de referencia ES2361733 es un sistema de separación industrial de distintos componentes basándose en el uso en serie de distintas columnas empaquetadas. No se trata en ningún momento de obtener un kit de detección rápida de la lactosa que pueda utilizarse por empresas alimentarias.

No existe por tanto en el estado de la técnica un proceso que pueda plantear la detección de la lactosa en superficies, aguas y alimentos mediante un ensayo rápido y sencillo que pueda presentarse como un kit rápido de detección, apto para la aplicación por cualquier empresa del sector, sin que sea necesaria la especialización de los operarios.

Descripción de la invención

El Kit de detección de lactosa, en superficies, aguas y alimentos, sobre una muestra obtenida de los mismos que aquí se propone comprende una solución de extracción de la lactosa de la muestra, donde dicha solución de extracción está contenida en un recipiente de extracción y presenta una cantidad de lactosa comprendida entre 0 y 50 mg/l.

Esta solución de extracción tiene 3 funciones principales que son extraer la lactosa de la muestra por disolución en fase acuosa, precipitar y aglutinar las proteínas y péptidos de pequeño tamaño que pueda contener la muestra para evitar interferencias en partes posteriores, y ajustar la sensibilidad del kit a una concentración determinada en función del

contenido de lactosa de la muestra y la dilución aplicada a la misma, a través de la adición de una pequeña cantidad de lactosa.

5 Esta cantidad de lactosa que se aporta a la muestra permite aumentar la sensibilidad del método, consiguiendo detectar cantidades muy reducidas que permitan conocer la existencia de lactosa a partir de los niveles determinados por la legislación, que exceden de lo permitido en alimentos que se puedan considerar libres de lactosa. Sin este aporte, sería imposible la detección de lactosa en las cantidades de trabajo utilizadas con esta técnica, dado que la muestra está diluida y no se permitiría la detección.

10

El kit comprende además una solución de separación y una cámara de separación hermética para la colocación de la misma, donde la solución de separación está formada por una mezcla que contiene al menos un disolvente apto para la separación de azúcares.

15 Así mismo comprende una tira de separación de la lactosa respecto a otros compuestos solubles en la muestra, mediante cromatografía.

La solución de separación ayuda a separar la lactosa de otros componentes de la muestra y concentrarla en una zona muy determinada de la tira de separación, en forma de banda.

20

El kit presenta además un primer recipiente de contención con una primera solución de visualización y al menos un segundo recipiente de contención con una segunda solución de visualización. La primera solución está formada por al menos P-anisaldehído y la segunda solución está formada por una mezcla de ácido sulfúrico y etanol absoluto.

25

Se aporta igualmente un pulverizador para el mezclado de la primera y la segunda soluciones de visualización.

30 Así pues, la mezcla de ambas soluciones de visualización tiene la función de agente de revelado de las tiras de separación, de manera que permite visualizar distintas manchas correspondientes a los distintos compuestos de la muestra analizada. Debido a la inestabilidad de la mezcla, se presentan como dos soluciones por separado que se mezclan justo en el momento previo a su uso.

35 Finalmente, el kit presenta un patrón de lactosa formado por una mezcla de agua destilada, lactosa en una proporción mayor a 15ppm y un conservante.

Este patrón tiene una primera función principal consistente en el control de calidad interno en cada uno de los ensayos. Así pues, el uso del patrón de lactosa permite asegurar que las fases de separación y visualización se han realizado de forma adecuada, eliminando de este modo la obtención de falsos negativos.

Así mismo, el patrón presenta una segunda función principal que reside en que facilita la visualización de los resultados, dado que la mancha que deja el patrón en la tira de separación, permite saber exactamente la altura a la que debe aparecer la mancha de lactosa de la muestra en caso de que contenga lactosa. Existen factores como la humedad, la temperatura, la propia muestra... que pueden hacer variar ligeramente la altura final de las manchas, por lo que el patrón de lactosa permite centrar en cada caso cuál debe ser el valor a obtener en caso de la existencia de lactosa.

En esta memoria se propone a su vez un procedimiento de detección de lactosa, en superficies, aguas y alimentos, mediante la aplicación de un kit de detección como el definido previamente.

Así pues, la primera fase es la obtención de una muestra y la homogeneización de la misma.

La segunda fase está formada por la introducción de la solución de separación en el interior de la cámara de separación y cierre hermético de la misma durante un tiempo comprendido entre 15 y 30min. Es importante colocar la solución de separación en el interior de la cámara de separación durante un tiempo previamente a su uso, para que la mezcla de disolventes de la fase líquida sature la fase gaseosa de la cámara.

A continuación, la tercera fase consiste en la colocación de una cantidad de 5 µl del resultado de la obtención y homogeneización de la muestra, en una tira de separación, en la primera marca indicativa de la línea de colocación de la muestra.

Igualmente, como una cuarta fase, se realiza la colocación de una cantidad de 5 µl del patrón de lactosa, en la misma tira de separación, en la segunda marca indicativa de la línea de colocación de la muestra.

La quinta fase consiste en un primer secado de la tira de separación a una temperatura comprendida entre 90 y 115°, durante un tiempo comprendido entre 30s y 10min.

A continuación, se realiza la sexta fase de introducción de la tira de separación en el interior de la cámara de separación y cerrado de la misma de nuevo, durante un tiempo comprendido entre 20 y 30 min, donde la tira de separación queda dispuesta con un ángulo de inclinación y orientada tal que el primer lateral está en una posición inferior respecto al segundo lateral.

Dicha tira de separación debe someterse a continuación a una séptima fase formada por un segundo secado a una temperatura comprendida entre 90 y 115°, durante un tiempo comprendido entre 30s y 10min;

La octava fase es la introducción del total de la segunda solución de visualización contenida en el segundo recipiente de contención, en un pulverizador y, seguidamente introducción de 0,1 ml del total de la primera solución de visualización contenida en el primer recipiente de contención, sobre la anterior en el mismo pulverizador y, agitado de la mezcla.

Una vez preparada la mezcla de ambas primera y segunda soluciones de visualización, se lleva a cabo la pulverización de forma uniforme de la tira de separación con la misma.

Finalmente, se realiza una fase de revelado de la tira de separación durante un tiempo comprendido entre 5 y 15 min, a una temperatura de entre 100 y 120° y, una última fase de interpretación de los resultados.

Con el kit de detección de lactosa y el procedimiento de detección mediante aplicación del mismo que aquí se propone se obtiene una mejora significativa del estado de la técnica.

Esto es así pues se consigue un modo de detección de la lactosa tanto en alimentos como en aguas y superficies, rápido y de fácil uso, que permite la presentación del mismo en un kit que puede ser utilizado por personas que no precisan de una especialización para ello.

Con este kit es posible realizar un control de la eficacia de la limpieza en superficies de trabajo y sistemas CIP, es decir, sistemas de limpieza in situ, sin desmontar equipos ni tuberías, además de validar la cadena de producción por análisis de semielaborados y producto terminado y liberar producto terminado.

Este kit se fundamenta en los principios de la cromatografía de capa fina para la separación y detección de lactosa en superficies, aguas y alimentos. Además de extraer la lactosa de la matriz de análisis, separa la misma de otros componentes solubles y visualiza la presencia o ausencia de la lactosa en la muestra.

5

Gracias a la aplicación de una solución de extracción, es posible ajustar la sensibilidad del kit a una concentración determinada de lactosa, mediante la adición de una pequeña cantidad de la misma. De este modo, dado que en la actualidad el valor mínimo permitido para poder considerar una muestra “sin lactosa” es de 100ppm según la legislación, el kit se
10 ajusta a estos valores, pero si el valor mínimo variara, el kit se prepararía con una sensibilidad apropiada para el nuevo valor.

De este modo el kit propuesto y el procedimiento de aplicación del mismo consiguen no sólo la detección de la existencia o no de lactosa, sino que además y como ventaja significativa,
15 consigue la identificación de la cantidad de lactosa con un punto de corte claro al límite legal, que actualmente es 100ppm, para poder nombrar un producto “sin lactosa”.

En la aplicación del kit para la detección de la lactosa, se realiza un secado controlado y a elevadas temperaturas, mediante un calentador, horno o similar, de manera que por un lado
20 se consigue una mayor rapidez de realización del proceso y por otro se logra una estandarización del secado a unas mismas condiciones de realización, lo que repercute posteriormente en los resultados obtenidos.

En lo referente a la velocidad del proceso de separación, mediante este kit se separa la
25 posible cantidad de lactosa existente en la muestra y no se actúa sobre el resto de sustancias, por lo que el proceso de separación es más rápido y tiene una duración de unos 25-30 minutos, frente a los 80-90 minutos de otros procesos.

Además, el kit presenta todos los elementos que se precisan para la detección de la lactosa,
30 no siendo ninguno de ellos un material nocivo que deba manipularse con extrema precaución, por lo que es un kit sencillo que puede ser utilizado por personal que no necesariamente deba tener una especial cualificación para ello.

Los elementos que contiene no suponen un coste muy elevado, por lo que este kit resulta
35 accesible para todas las empresas que precisen de una detección de presencia de lactosa y

pueden aplicarlo ellos mismos, sin necesidad de recurrir a empresas externas, por lo que se consigue un coste reducido y mayor rapidez.

5 Además, el proceso se realiza siguiendo unas pautas sobre los elementos aportados en el kit, sin necesidad de impregnar y/o cortar placas, preparar reactivos, ajustar parámetros como la dilución..., por lo que resulta más sencillo y apto para poder aplicarlo en la propia empresa, sin necesidad de mandar las muestras a un laboratorio.

10 Por tanto, es un kit muy efectivo, apto para aplicarse en condiciones dispares de temperatura y humedad, según el lugar en que se emplee, pues la aplicación del patrón de lactosa aporta la medida en cada caso en concreto según las condiciones ambientales y concretas de la medición. Esto resulta una ventaja relevante respecto al método de cromatografía de capa fina estándar, dado que el tener que mantener siempre unas mismas condiciones ambientales resulta una importante limitación.

15

Así mismo es capaz de detectar la presencia o ausencia de lactosa con la necesaria sensibilidad para determinar si la cantidad existente está en una proporción que supera un límite legislativo.

20 **Breve descripción de los dibujos**

Con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características del invento, de acuerdo con un ejemplo preferente de realización práctica del mismo, se aporta como parte integrante de dicha descripción, una serie de dibujos donde, con carácter ilustrativo y no
25 limitativo, se ha representado lo siguiente:

La Figura 1.- Muestra una vista en planta de una tira de separación de la lactosa, para un modo de realización preferente de la invención.

30 Las Figuras 2.1 a 2.4.- Muestra una vista en planta de tiras de separación de la lactosa en las que los resultados obtenidos respectivamente, han sido positivo, negativo, y dos posibles caso de no válido, para un modo de realización preferente de la invención.

35 La Figura 3.1 y 3.2.- Muestra unas vistas en alzado y perfil de la cámara de separación en la fase de introducción de la tira de separación en el interior de una tira de separación de la lactosa, para un modo de realización preferente de la invención.

La Figura 4.- Muestra un diagrama de bloques del procedimiento de detección de lactosa, en superficies, aguas y alimentos, mediante un kit como el definido, para un modo de realización preferente de la invención.

5

Descripción detallada de un modo de realización preferente de la invención

A la vista de las figuras aportadas, puede observarse cómo en un modo de realización preferente de la invención, el kit de detección de lactosa, en superficies, aguas y alimentos, sobre una muestra obtenida de los mismos que aquí se presenta, comprende varios elementos que se detallan a continuación.

Así pues, comprende una solución de extracción de la lactosa de la muestra, donde dicha solución de extracción está contenida en un recipiente de extracción y presenta una cantidad de lactosa comprendida entre 0 y 50 mg/l. En función de la dilución utilizada y del tipo de muestra es necesario aportar una mayor o menor cantidad de lactosa, pues si presenta 100ppm, al diluirse la cantidad disminuye y es más difícil de detectar, ya que puede situarse por debajo de la cantidad mínima necesaria para la visualización posterior en la tira de separación (19), por lo que el aporte de lactosa de la solución de extracción permite que sí sea posible la detección.

En este modo de realización preferente de la invención, se realiza una dilución de 1/5, por lo que si el producto presentara una cantidad menor o igual a las 100ppm de lactosa, la muestra diluida presentaría 20ppm. Así pues, la solución de extracción va a presentar en este caso 20mg/l de lactosa, para que la concentración en la muestra ascienda a 40ppm en caso de que realmente exista presencia de lactosa, y este valor ya es detectable mediante este método de detección.

En este modo de realización preferente de la invención, se considera que la muestra a analizar proviene de un alimento. Así pues, la solución de extracción comprende además de la lactosa, agua destilada, un conservante formado por ácido benzoico y un reactivo de desproteínización formado por acetato de zinc, tungstato de sodio, ácido sulfúrico, ácido tricloroacético, ácido perclórico, éter o acetona.

En este modo de realización preferente de la invención, el reactivo de desproteínización utilizado es acetato de zinc.

El kit de detección comprende también una solución de separación (17) y una cámara de separación (18) hermética para la colocación de la misma. Esta solución de separación (17) está formada por una mezcla que contiene al menos un disolvente apto para la separación de azúcares.

En este modo de realización preferente de la invención, la solución de separación (17) está formada por un disolvente que en concreto es acetona y comprende además agua destilada.

En otros modos de realización, el disolvente puede estar formado por acetato de etilo, isopropanol, N-Butanol, tampón de fosfato, metanol, cloroformo, hidróxido de amonio, ácido acético y/o N-propanol.

Como se muestra en la Figura 1, este kit cuenta además con una tira de separación (19) de la lactosa respecto a otros compuestos solubles en la muestra, mediante cromatografía. Esta tira de separación (19) presenta forma rectangular con un primer y segundo laterales (19.1, 19.2) opuestos de menor longitud.

De forma paralela a ambos primer y segundo laterales (19.1, 19.2) presenta una primera línea (20) de colocación de la muestra próxima al primer lateral (19.1) y una segunda línea (21) de fin de la subida de la solución de separación (17), próxima al segundo lateral (19.2).

En este modo de realización preferente de la invención, la tira de separación (19) de la lactosa está compuesta por un cromatofolio de gel de sílice 60, pero en otros modos de realización puede estar compuesta de celulosa, de kieselguhr, o de una combinación de gel de sílice y kieselguhr.

Así mismo, en este modo de realización preferente de la invención, la tira de separación (19) de la lactosa presenta una impregnación de acetato de sodio, pero en otros modos de realización en los que la composición de la tira de separación sea diferente, puede presentar una impregnación en borato de sodio, ácido bórico o bisulfito de sodio.

Como puede observarse en la Figura 1, la tira de separación (19) de la lactosa presenta sobre la primera línea (20) de colocación de la muestra, una primera y una segunda marcas (22, 23) indicativas del lugar de colocación de la muestra y del patrón de lactosa,

respectivamente, donde ambas primera y segunda marcas (22, 23) indicativas están separadas entre sí.

5 El kit de detección comprende un primer recipiente de contención con una primera solución de visualización y al menos un segundo recipiente de contención con una segunda solución de visualización.

10 La primera solución está formada al menos por P-anisaldehído, siendo en este modo de realización formada únicamente por P-anisaldehído y, la segunda solución está formada por una mezcla de ácido sulfúrico y etanol absoluto.

15 Así pues, en este modo de realización preferente de la invención, el primer recipiente de contención de la primera solución de visualización comprende una cantidad entre 2 y 3 ml de la misma, siendo en este caso de 2,5ml y, el segundo recipiente de contención de la segunda solución comprende una mezcla de 1,8ml de etanol absoluto y 0,1ml de ácido sulfúrico.

20 En este modo de realización preferente de la invención el kit de detección comprende un primer recipiente de contención y 25 segundos recipientes de contención, para que resulte válido para realizar 25 test de detección. En otros modos de realización, el kit puede contener otras cantidades distintas, válidas para un número diferente de test de detección.

25 El kit comprende además un pulverizador para el mezclado de la primera y la segunda soluciones de visualización y un patrón de lactosa formado por una mezcla de agua destilada, lactosa en una proporción mayor a 15ppm y un conservante. En este modo de realización preferente de la invención se considera un patrón de lactosa con una concentración de 100ppm de la misma.

30 En este modo de realización preferente de la invención, el conservante del patrón de lactosa está formado por ácido benzoico.

35 En esta memoria se propone así mismo, un procedimiento de detección de lactosa, en superficies, aguas y alimentos, mediante la aplicación de un kit de detección como el definido previamente.

Este procedimiento presenta una primera fase consistente en la obtención y homogeneización (1) de una muestra.

5 En este modo de realización preferente de la invención, en el que se ha considerado que la detección de lactosa se realiza sobre un alimento, dicha fase de obtención y homogeneización (1) de la muestra comprende una primera etapa de removido o triturado (2) del alimento.

10 Así mismo, dicha primera fase comprende una segunda etapa de introducción (3) de una porción de la muestra en un recipiente de extracción que contiene una solución de extracción para agitar luego el recipiente hasta obtener la homogeneización del conjunto y, una tercera etapa de filtrado (4) del conjunto homogeneizado anterior, mediante un papel del filtro. Para ello la porción de la muestra que se debe utilizar es de entre 0,5 y 1g, por tratarse de un alimento sólido (AS). En este modo de realización tomamos 0,5g.

15 En otro modo de realización preferente de la invención, en el que el producto a analizar sea un alimento líquido (AL) o semilíquido, la segunda y tercera etapas son iguales que para el caso de alimentos sólidos (AS), y la porción de muestra a utilizar es de 2ml.

20 En otro modo de realización, en el que el producto a analizar sea una superficie (S), la fase de obtención y homogeneización (1) de la muestra comprende una primera etapa de toma de un hisopo (5.1), humedecido (5.2) del mismo con solución de extracción y frotado (5.3) de un área de la superficie a testar equivalente a 5cm^2 y, una segunda y tercera etapas iguales a los casos anteriores, siendo la porción de muestra a utilizar un extremo del hisopo.

25 En otro modo de realización preferente, en el que el producto a analizar sea aguas (A) de limpieza, la fase de obtención y homogeneización (1) de la muestra comprende una primera etapa de toma de una cantidad directa (6) de las mismas y una segunda y tercera etapas iguales a los casos anteriores, siendo la porción de muestra 2ml.

30 La segunda fase consiste en la introducción (7) de la solución de separación (17) en el interior de la cámara de separación (18) y cierre hermético de la misma durante un tiempo comprendido entre 15 y 30min. En este modo de realización preferente de la invención, se mantiene un tiempo de 20min.

35

A continuación, se realiza una tercera fase de colocación (8) de una cantidad de 5 µl del resultado de la obtención y homogeneización de la muestra, en una tira de separación (19), en la primera marca (22) indicativa del lugar de colocación de la muestra, seguida de una cuarta fase de colocación (9) de una cantidad de 5 µl del patrón de lactosa, en la misma tira de separación (19), en la segunda marca (23) indicativa del lugar de colocación del patrón de lactosa.

La quinta fase consiste en un primer secado (10) de la tira de separación (19) a una temperatura comprendida entre 90 y 115°, durante un tiempo comprendido entre 30s y 10min. En este modo de realización preferente de la invención, el secado se realiza mediante un calentador a una temperatura de 100°C, durante 45s.

Y, una vez seca la tira de separación (19) con las muestras, se realiza la sexta fase de introducción (11) de la misma en el interior de la cámara de separación (18) y cerrado de la cámara de nuevo, durante un tiempo comprendido entre 20 y 30 min. La tira de separación (19) se debe situar tal y como se muestra en las Figuras 3.1 y 3.2, con un ángulo de inclinación y orientada tal que el primer lateral (19.1) está en una posición inferior respecto al segundo lateral (19.2). En este modo de realización preferente de la invención, la tira de separación se mantiene en el interior de la cámara de separación un tiempo de 26min.

En esta fase, se produce la ascensión de la solución de separación (17) por la tira de separación (19), hasta la segunda línea (21) de fin de la subida de la solución de separación (17).

A continuación, la séptima fase consiste en un segundo secado (12) a una temperatura comprendida entre 90 y 115°, durante un tiempo comprendido entre 30s y 10min. En este modo de realización preferente de la invención, el secado se realiza mediante un calentador a una temperatura de 100°C, durante 6min.

Con la tira de separación (19) ya seca, se realiza una octava fase de introducción (13) del total de la segunda solución de visualización contenida en el segundo recipiente de contención, en un pulverizador y seguidamente introducción de 0,1 ml del total de la primera solución de visualización contenida en el primer recipiente de contención, sobre la anterior en el mismo pulverizador y, agitado de la mezcla.

En este modo de realización preferente de la invención, la cantidad de la segunda solución de visualización contenida en el segundo recipiente de contención se ha indicado que es una mezcla de 1,8ml de etanol absoluto y 0,1ml de ácido sulfúrico. Esta cantidad aportada es la necesaria para la realización de un test. Así mismo, a esta segunda solución, una vez se introduce en el pulverizador, se le añade 0,1ml de P-anisaldehído, que se toma con una pipeta del total de primera solución de visualización contenida en el primer recipiente.

Con esta mezcla de soluciones de visualización, se realiza la novena fase de pulverización (14) de forma uniforme de la tira de separación (19) con la mezcla de la primera y la segunda soluciones de visualización.

La tira de separación (19) se pulveriza hasta que queda empapada y se procede a una undécima fase de revelado (15) de la tira de separación durante un tiempo comprendido entre 5 y 15 min, a una temperatura de entre 100 y 120°. En este modo de realización preferente de la invención, el revelado tiene lugar durante 10min, a una temperatura de 110°C.

Dado que en la tira de separación (19) siempre se deposita muestra y patrón de lactosa, la mancha de lactosa (24) que aparece en la tira de separación (19) como consecuencia del patrón de lactosa, va a mostrar la altura a la que debe aparecer una banda (25) parecida para la muestra, en el caso en que esta sí presente lactosa en una proporción igual o superior al límite de la legislación, en este caso 100ppm.

La última fase es la de interpretación (16) de los resultados.

Así pues, puede ocurrir que el resultado obtenido de una muestra sea el que aparece en la Figura 2.1. En este caso, como puede observarse, en dicha Figura 2.1, en la vertical de la muestra aparece una banda (25) a la misma altura que la mancha de lactosa (24) correspondiente al patrón de lactosa, por lo que el resultado obtenido es positivo y puede afirmarse que la muestra contiene una concentración igual o superior a 100ppm de lactosa.

El resto de manchas (26) que aparece sobre la vertical correspondiente a la muestra, representan a los distintos carbohidratos de la muestra analizada.

Puede ocurrir igualmente que el resultado obtenido sea el que aparece en la Figura 2.2, en cuyo caso, se observa que en la vertical de la muestra no aparece ninguna banda a la

misma altura que la mancha de lactosa (24) correspondiente al patrón de lactosa, por lo que puede afirmarse que no existe en la muestra una concentración de lactosa que alcance las 100ppm.

5 Así mismo, pueden ocurrir otros dos casos representados en las Figuras 2.3 y 2.4. En ambas Figuras se observa que existe una ausencia de manchas en la vertical del patrón de lactosa, que en la Figura 2.4 además se suma a una ausencia de manchas también en la vertical de la muestra. En ambos casos el resultado no es válido, pues significa que el test no se ha desarrollado de forma adecuada y por tanto debe ser invalidado este resultado.

10

La forma de realización descrita constituye únicamente un ejemplo de la presente invención, por tanto, los detalles, términos y frases específicos utilizados en la presente memoria no se han de considerar como limitativos, sino que han de entenderse únicamente como una base para las reivindicaciones y como una base representativa que proporcione una descripción
15 comprensible así como la información suficiente al experto en la materia para aplicar la presente invención.

REIVINDICACIONES

- 1- Kit de detección de lactosa, en superficies, aguas y alimentos, sobre una muestra obtenida de los mismos, **caracterizado por que** comprende
- 5
- una solución de extracción de la lactosa de la muestra, donde dicha solución de extracción está contenida en un recipiente de extracción y presenta una cantidad de lactosa comprendida entre 0 y 50 mg/l;
 - una solución de separación (17) y una cámara de separación (18) hermética para la colocación de la misma, donde la solución de separación (17) está formada por una

10

 - mezcla que contiene al menos un disolvente apto para la separación de azúcares;
 - una tira de separación (19) de la lactosa respecto a otros compuestos solubles en la muestra, mediante cromatografía;
 - un primer recipiente de contención con una primera solución de visualización y al menos un segundo recipiente de contención con una segunda solución de

15

 - visualización, donde la primera solución está formada al menos por P-anisaldehído y la segunda solución está formada por una mezcla de ácido sulfúrico y etanol absoluto;
 - un pulverizador para el mezclado de la primera y la segunda soluciones de visualización, y;

20

 - un patrón de lactosa formado por una mezcla de agua destilada, lactosa en una proporción de mayor a 15ppm y un conservante.
- 2- Kit de detección de lactosa, según la reivindicación 1, **caracterizado por que** la solución de extracción comprende además agua destilada, un conservante formado por
- 25
- ácido benzoico y un reactivo de desproteínización formado por acetato de zinc, tungstato de sodio, ácido sulfúrico, ácido tricloroacético, ácido perclórico, éter o acetona.
- 3- Kit de detección de lactosa, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores,
- 30
- caracterizado por que** el al menos un disolvente de la solución de separación (17) está formado por acetato de etilo, isopropanol, N-Butanol, acetona, tampón de fosfato, metanol, cloroformo, hidróxido de amonio, ácido acético y/o N-propanol.
- 4- Kit de detección de lactosa, según la reivindicación 3, **caracterizado por que** la
- 35
- solución de separación (17) comprende agua destilada.

- 5- Kit de detección de lactosa, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la tira de separación (19) de la lactosa presenta forma rectangular con un primer y segundo laterales (19.1, 19.2) opuestos de menor longitud, una primera línea (20) de colocación de la muestra próxima al primer lateral (19.1) y paralela al mismo, y una segunda línea (21) de fin de la subida de la solución de separación (17) próxima al segundo lateral (19.2) y paralela al mismo.
- 6- Kit de detección de lactosa, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la tira de separación (19) de la lactosa está compuesta por un cromatofolio de gel de sílice 60, de celulosa, de kieselguhr, o de una combinación de gel de sílice y kieselguhr.
- 7- Kit de detección de lactosa, según la reivindicación 6, **caracterizado por que** la tira de separación (19) de la lactosa presenta una impregnación de acetato de sodio, borato de sodio, ácido bórico o bisulfito de sodio.
- 8- Kit de detección de lactosa, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** la tira de separación (19) de la lactosa presenta sobre la primera línea (20) de colocación de la muestra, una primera y una segunda marcas (22, 23) indicativas del lugar de colocación de la muestra y del patrón de lactosa respectivamente, donde dichas primera y segunda marcas (22, 23) indicativas están separadas entre sí.
- 9- Kit de detección de lactosa, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el primer recipiente de contención de la primera solución de visualización comprende una cantidad entre 2 y 3 ml de la misma y el segundo recipiente de contención de la segunda solución comprende una mezcla de 1,8ml de etanol absoluto y 0,1ml de ácido sulfúrico.
- 10- Kit de detección de lactosa, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado por que** el conservante del patrón de lactosa está formado por ácido benzoico.
- 11- Procedimiento de detección de lactosa, en superficies, aguas y alimentos, mediante la aplicación de un kit de detección como el definido en las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado por que** comprende las fases

- obtención y homogeneización (1) de una muestra;
 - introducción (7) de la solución de separación (17) en el interior de la cámara de separación (18) y cierre hermético de la misma durante un tiempo comprendido entre 15 y 30min;
 - 5 - colocación (8) de una cantidad de 5 µl del resultado de la obtención y homogeneización, en una tira de separación (19), en la primera marca (22) indicativa de la primera línea (21);
 - colocación (9) de una cantidad de 5 µl del patrón de lactosa, en la misma tira de separación (19), en la segunda marca (23) indicativa de la segunda línea (21);
 - 10 - primer secado (10) de la tira de separación (19) a una temperatura comprendida entre 90 y 115°, durante un tiempo comprendido entre 30s y 10min;
 - introducción (11) de la tira de separación (19) en el interior de la cámara de separación (18) y cerrado de la misma de nuevo, durante un tiempo comprendido entre 20 y 30 min, donde la tira de separación (19) queda dispuesta con un ángulo de inclinación y orientada tal que el primer lateral (19.1) está en una posición inferior
 - 15 respecto al segundo lateral (19.2);
 - segundo secado (12) a una temperatura comprendida entre 90 y 115°, durante un tiempo comprendido entre 30s y 10min;
 - introducción (13) del total de la segunda solución de visualización contenida en el
 - 20 segundo recipiente de contención en un pulverizador y seguidamente introducción de 0,1 ml de la primera solución de visualización sobre la anterior en el mismo pulverizador y agitado de la mezcla;
 - pulverización (14) de forma uniforme de la tira de separación (19) con la mezcla de la primera y la segunda soluciones de visualización;
 - 25 - revelado (15) de la tira de separación (19) durante un tiempo comprendido entre 5 y 15 min, a una temperatura de entre 100 y 120°;
 - interpretación (16) de los resultados.
- 12- Procedimiento de detección de lactosa, según la reivindicación 11, **caracterizado por**
- 30 **que** en el caso en que el producto a analizar está formado por alimentos líquidos o sólidos (AL, AS), la fase de obtención y homogeneización (1) de la muestra comprende una primera etapa de removido o triturado (2) del alimento.
- 13- Procedimiento de detección de lactosa, según la reivindicación 11, **caracterizado por**
- 35 **que** en el caso de superficies (S), la fase de obtención y homogeneización (1) de la muestra comprende una primera etapa de toma de un hisopo (5.1), humedecido (5.2)

del mismo con solución de extracción y frotado (5.3) de un área de la superficie a testar equivalente a 5cm².

- 5 14- Procedimiento de detección de lactosa, según la reivindicación 11, **caracterizado por que** en el caso de aguas (A), la fase de obtención y homogeneización (1) de la muestra comprende una primera etapa de toma (6) de una cantidad directa de las mismas.
- 10 15- Procedimiento de detección de lactosa, según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, **caracterizado por que** la fase de obtención y homogeneización (1) de la muestra comprende una segunda etapa de introducción y dilución (3) de una porción de la muestra en un recipiente de extracción que contiene una solución de extracción, y agitar el recipiente hasta obtener la homogeneización del conjunto y una tercera etapa de filtrado (4) del conjunto homogeneizado anterior, mediante un papel del filtro, donde la porción de la muestra está formada por un extremo del hisopo en el caso de superficies
- 15 (S), entre 0,5 y 1g en el caso de alimentos sólidos (AS) o por 2ml en el caso de aguas (A) o alimentos líquidos (AL) o semilíquidos respectivamente.

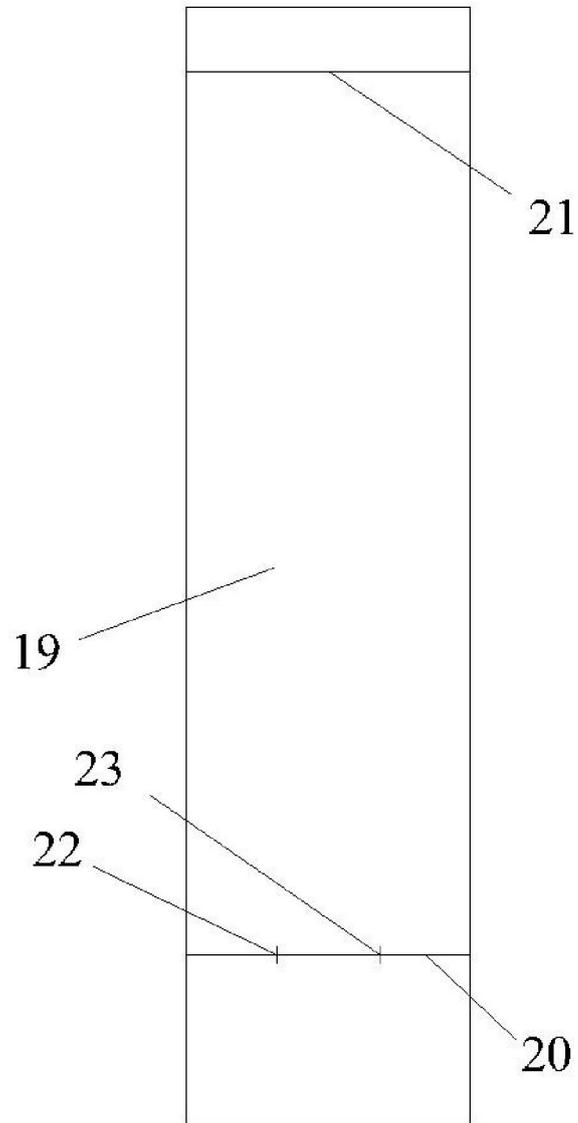
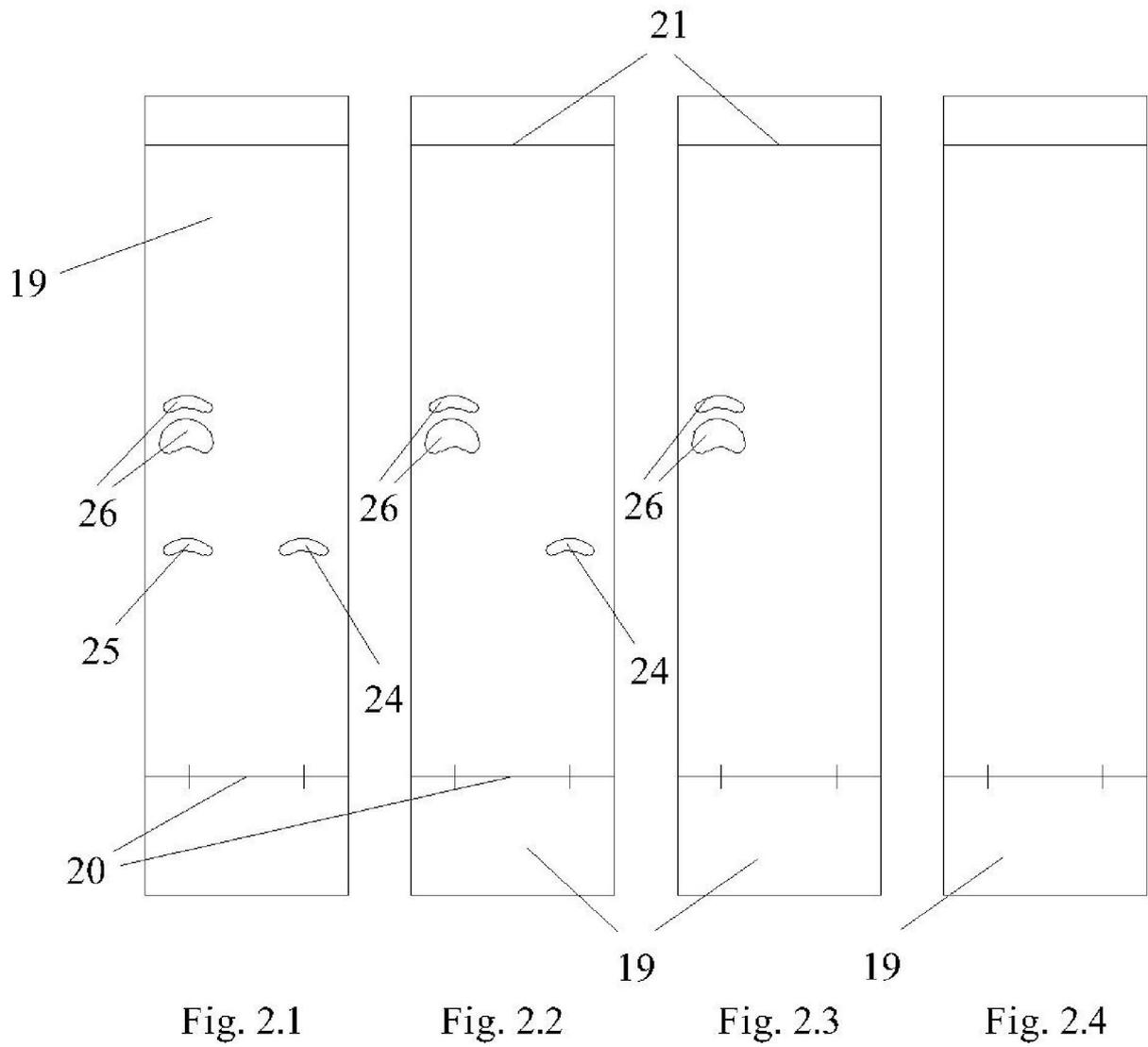


Fig. 1



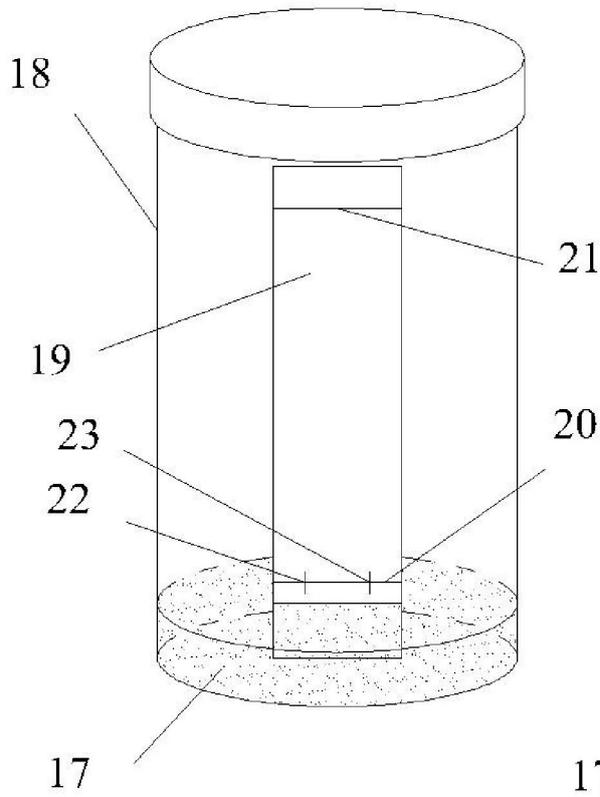


Fig. 3.1

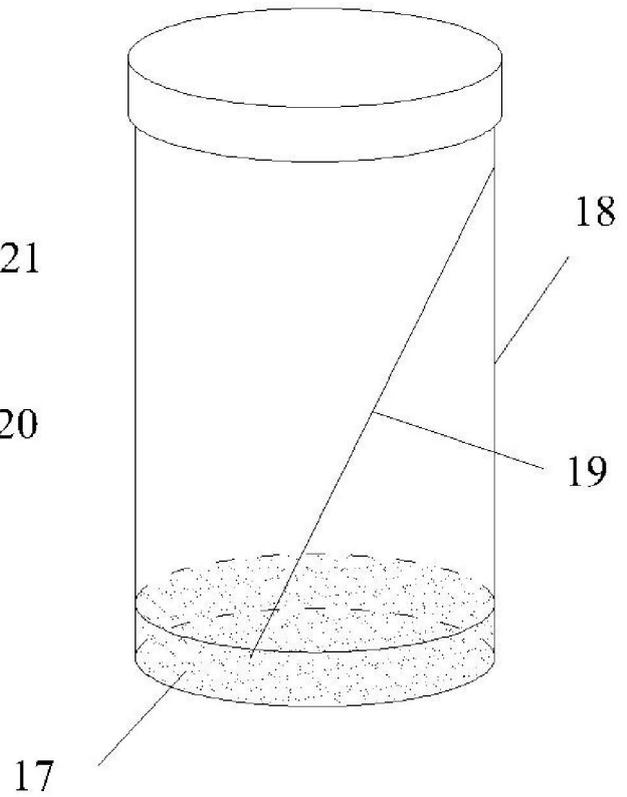


Fig. 3.2

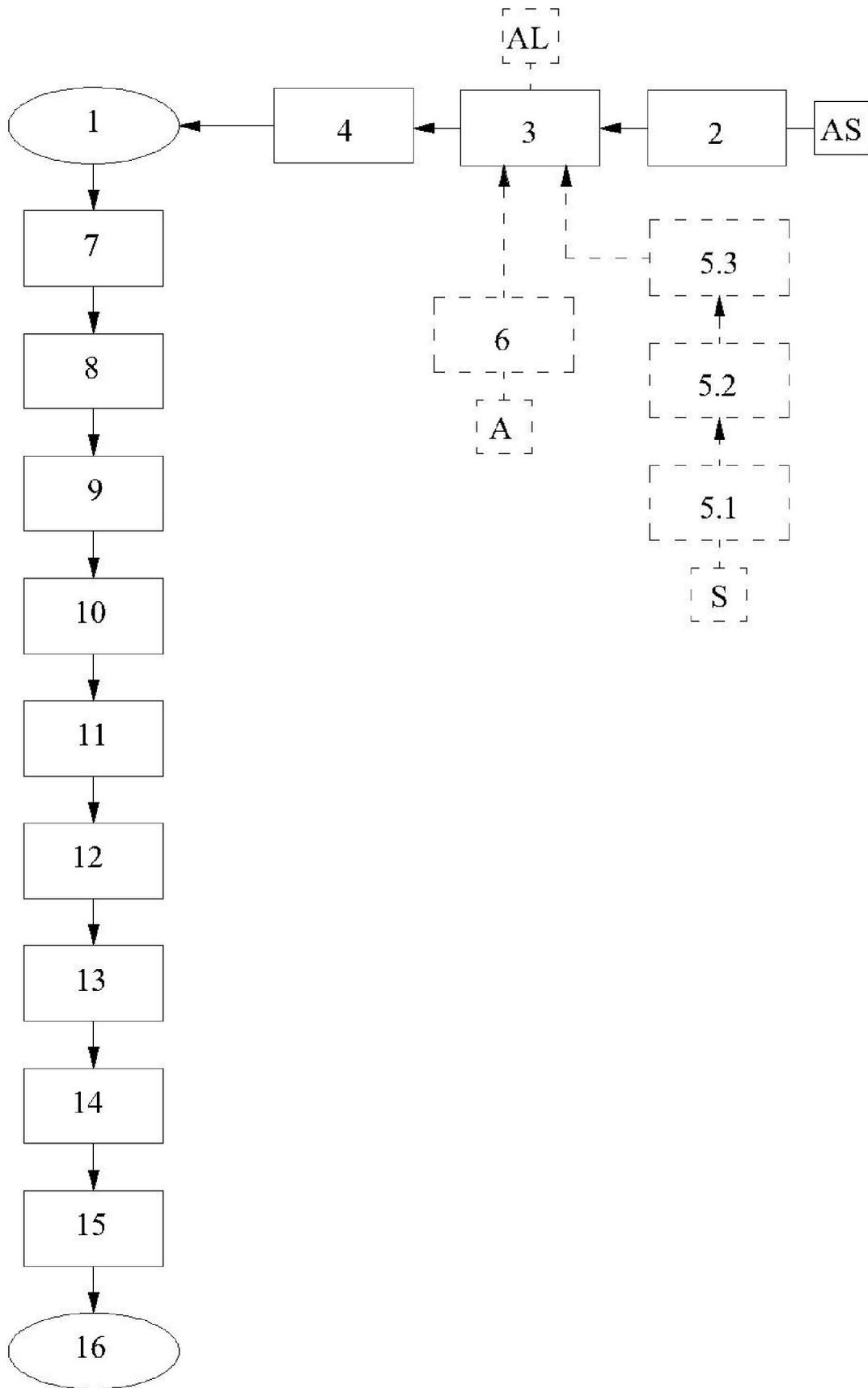


Fig. 4