

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 778 052**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/02 (2006.01)

C12Q 1/6806 (2008.01)

G01N 1/34 (2006.01)

G01N 1/38 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

B01D 17/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.05.2012 PCT/EP2012/001979**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.11.2013 WO13167150**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2012 E 12720424 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 2847570**

54 Título: **Reactivo para clarificar emulsiones y método de clarificación**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.08.2020

73 Titular/es:

BENTLEY INSTRUMENTS S.A.R.L. (100.0%)
14 rue d'Holbach
59000 Lille, FR

72 Inventor/es:

PAUTZ, NORBERT y
BROUTIN, PIERRE

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 778 052 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

Reactivo para clarificar emulsiones y método de clarificación

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un reactivo para clarificar emulsiones de aceite/grasa en agua (O/W) y a un método para clarificar dichas emulsiones en donde se usa el reactivo, así como a un kit de partes que comprenden los componentes del reactivo para la preparación *in situ* de los mismos.

10

Antecedentes de la invención

La clarificación de las emulsiones de O/W hasta el punto en que sean un líquido transparente es particularmente importante para fines analíticos. Por ejemplo, las partículas sólidas insolubles en una emulsión solo se pueden determinar, si es que se pueden llegar a determinar, con dificultades. Si la emulsión no se clarifica al menos hasta el punto en que es translúcida, no es posible un recuento de partículas insolubles sólidas en la emulsión, por ejemplo, por métodos ópticos.

15

La cuantificación de la contaminación biológica en las emulsiones es de particular importancia, ya que la emulsión en todas las áreas donde se emplean, pero en particular en alimentos, bebidas y productos sanitarios y/o cosméticos, puede volverse inutilizable y/o un riesgo para la salud cuando la contaminación por bacterias, levaduras o algas exceden ciertos valores umbral.

20

Con respecto a la determinación de microorganismos vivos en emulsiones, es muy deseable contar con un reactivo y un método que pueda clarificar la emulsión en un líquido completamente transparente en el menor tiempo y a la temperatura más baja posibles para permitir una correcta determinación cuantitativa rápida y directa de los organismos, por ejemplo, por medios ópticos. Si la clarificación de la emulsión no está completa, los recuentos pueden ser incorrectos, por ejemplo, debido a los agregados similares a partículas restantes, y si la temperatura es demasiado alta y el tiempo de procesamiento es demasiado largo, los microorganismos por un lado pueden destruirse, o por otro, pueden proliferar dando lugar a resultados de pruebas falsos.

25

30

En particular con respecto a la leche que es una emulsión de grasa en agua, hay una serie de métodos descritos en la técnica anterior que tienen como objetivo la clarificación de la leche para formar un líquido transparente (véanse, por ejemplo, las patentes US 3679365 A, EP 0246987 B1, DE OS 17089 A1, DE 4017398 A1 y EP 0573054 A1, que desvelan la clarificación de la leche por medio de una solución salina acuosa en presencia de un tensioactivo a pH neutro y una temperatura de 49-60 °C. Además, la patente US 4708939 A describe la clarificación de un fluido biológico, en particular suero sanguíneo humano, por un agente que contiene un triglicérido polietoxilado con un valor de HLB de 4 a 14, un n-alcano sulfonato secundario, y opcionalmente un tensioactivo no aniónico adicional, en solución acuosa opcionalmente tamponada. Sin embargo, ninguno de estos métodos ha demostrado ser satisfactorio en condiciones de uso rutinario.

35

40

El objetivo de la presente invención era encontrar una solución más satisfactoria para convertir las emulsiones en líquidos transparentes.

45 Sumario de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a un reactivo para clarificar emulsiones de aceite/grasa en agua (también denominadas emulsiones de O/W) que comprende una solución acuosa de una o más sales que tienen una solubilidad en agua de al menos aproximadamente 1 mol/l, uno o más primeros tensioactivos no iónicos que tienen un valor de HBL de aproximadamente 8,0 a aproximadamente 13,0 y un punto de enturbiamiento de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 45 °C y uno o más segundos tensioactivos no iónicos que tienen un valor de HBL de aproximadamente 13,1 a aproximadamente 16,9 y un punto de enturbiamiento de aproximadamente 59 °C a aproximadamente 100 °C, en donde el reactivo tiene un punto de enturbiamiento igual o inferior a aproximadamente 57 °C, caracterizado por que la proporción de la cantidad de sal o sales a tensioactivo o tensioactivos es de aproximadamente 0,25 mol a aproximadamente 2 mol por 100 g de tensioactivo o tensioactivos totales y la concentración de la sal o sales en el reactivo es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 12 mol/l.

50

55

En otro aspecto, la invención se dirige al uso de dicho reactivo para clarificar una emulsión de O/W.

60

En otro aspecto más, la invención se refiere a un método para clarificar una emulsión de O/W, en donde se añade un reactivo de acuerdo con la invención a la emulsión en una cantidad predeterminada y la mezcla del reactivo y la emulsión se mantiene a temperatura ambiente o se calienta a una temperatura elevada hasta aproximadamente el punto de ebullición de la mezcla y se mantiene durante un período de tiempo suficiente a la temperatura, hasta que la emulsión se ha clarificado y se ha convertido en un líquido transparente.

65

Todavía otro aspecto de la invención se refiere a un kit de piezas para preparar el reactivo de la invención *in situ*,

que comprende dicha una o más sales, dicho uno o más primeros tensioactivos, dicho uno o más segundos tensioactivos y opcionalmente dicho tampón en al menos dos contenedores separados.

Breve descripción de los dibujos

5 La Figura 1 es un diagrama que muestra la correlación entre una determinación de recuentos de bacterias en una muestra de leche cruda de acuerdo con una realización del método de la presente invención y de acuerdo con el método BactoCount® (Bentley Instruments).

10 La Figura 2 es un diagrama que muestra la correlación entre una determinación de recuentos de células somáticas en una muestra de leche cruda de acuerdo con otra realización del método de la presente invención y de acuerdo con el método BactoCount® (Bentley Instruments).

15 La Figura 3 es un diagrama que muestra la correlación entre una determinación de recuentos de células somáticas en una muestra de leche cruda de acuerdo con otra realización más del método de la presente invención y de acuerdo con el método BactoCount® (Bentley Instruments).

Descripción detallada

20 El primer aspecto de la invención se refiere a un reactivo para clarificar emulsiones de O/W.

Las emulsiones de O/W son bien conocidas por el experto en la materia y se usan en una amplia variedad de áreas de aplicación diferentes. Los ejemplos son emulsiones técnicas, por ejemplo, lubricantes refrigerantes, emulsiones domésticas, por ejemplo, detergentes para lavar platos, emulsión utilizada para productos cosméticos, sanitarios y farmacéuticos, por ejemplo, cremas faciales, lociones corporales y varias cremas farmacéuticas, y emulsiones de alimentos y bebidas, por ejemplo, helados, yogurt, nata, leche y otros productos lácteos.

30 En muchos casos, en particular para fines analíticos, es deseable una clarificación de dichas emulsiones en líquidos transparentes similares al agua, al menos translúcidos o completamente transparentes, por medio de un reactivo adecuado. El reactivo debe cumplir con dos requisitos importantes: clarificar una O/W a una temperatura relativamente baja y lograrlo en un tiempo relativamente corto. Además, el reactivo debe ser compatible con posibles microorganismos en las emulsiones, es decir, ni causar la destrucción ni causar la proliferación de los mismos.

35 Sorprendentemente, se encontró que un reactivo que comprende una o más sales y dos tipos diferentes de tensioactivos o mezclas de tensioactivos no iónicos, como se describe en el Sumario de la invención anterior, cumple estos requisitos.

40 La sal contenida en el reactivo de la presente invención debe tener una alta solubilidad en agua de al menos 1 mol/litro. Las altas concentraciones de sal son capaces de inhibir la lisis de microorganismos que de otro modo podrían ser inducidos por los tensioactivos no iónicos en el reactivo.

45 Si se van a detectar microorganismos en una emulsión que se va a tratar con el reactivo de la invención, a veces es preferible que las sales no contengan iones de Na^+ y K^+ en concentraciones superiores a las fisiológicas, es decir, 154 mmol/l y 4 mmol/l, ya que a veces pueden contribuir a la lisis de microorganismos.

Dado que el catión amonio generalmente proporciona muy buena solubilidad en agua y es fisiológicamente compatible, es el catión preferido en la sal o sales del reactivo.

50 También debido a la buena solubilidad en agua de la sal o sales del reactivo, su anión o aniones se seleccionan preferiblemente entre cloruro, fluoruro, nitrato, formiato y acetato.

El cloruro de amonio y el formiato de amonio son sales particularmente preferidas, ya sea solas o mezcladas.

55 La concentración total de la sal o sales en el reactivo es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 12 mol/l, más a menudo de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 5 mol/l, y se prefiere particularmente de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,5 mol/l.

60 El primer tensioactivo o tensioactivos no iónicos tienen cada uno un valor de HLB de aproximadamente 8,0 a aproximadamente 13,0 y un punto de enturbiamiento de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 45 °C, mientras que el segundo tensioactivo o tensioactivos no iónicos tienen cada uno un valor de HLB de aproximadamente 13,1 a aproximadamente 16,9 y un punto de enturbiamiento de aproximadamente 59 °C a aproximadamente 100 °C. (Los valores de HLB en este documento son los bien conocidos para tensioactivos no iónicos según Griffin).

65 Los tensioactivos no iónicos son bien conocidos por el experto en la materia (véase, por ejemplo, Jean-Louis Salager, SURFACTANTS, Types and Uses, FIRP BOOKLET #E300-A (2002), Capítulo 4 - Nonionic Surfactants, incorporados como referencia en este documento). Los tensioactivos no iónicos generalmente se seleccionan entre

alcoholes lineales etoxilados (también denominados alquil éteres de polioxietileno, etoxilatos de alcohol graso o CnEm), alquifenoles etoxilados, ésteres de ácidos grasos, derivados de amina y amida, alquilpoliglucósidos, copolímeros de óxido de etileno/óxido de propileno y polialcoholes y poli alcoholes etoxilados, tioles (mercaptanos) y sus derivados.

5 El experto en la materia sabe bien que la capacidad de un tensioactivo no iónico para disolver aceite o grasa aumenta con el incremento del valor de HLB. Por lo tanto, es necesario un tensioactivo que tenga un alto valor de HLB para clarificar la emulsión de O/W que tiene un alto contenido de aceite o grasa. Por otro lado, un valor alto de HLB suele ir acompañado de una temperatura del punto de enturbiamiento elevada (aunque esa temperatura
10 también depende de otros parámetros, véase más abajo). Esto significa que una mezcla que comprende una emulsión y un tensioactivo que tiene una alta temperatura del punto de enturbiamiento debe calentarse a aproximadamente esta última temperatura para iniciar la clarificación de la mezcla, lo que no es deseable cuando se tienen que determinar los microorganismos, ya que se someten a lisis incluso en tensioactivos no iónicos a temperaturas más altas. Al enfriarse por debajo del punto de enturbiamiento, los agentes tensioactivos no iónicos
15 forman micelas. Estas micelas son mucho más pequeñas que la longitud de onda de la luz, por lo que la solución se vuelve transparente y la solubilidad del aceite/grasa aumenta significativamente.

Se requiere que el reactivo de la invención tenga un punto de enturbiamiento de un máximo de 57 °C, que es el límite superior de compatibilidad con microorganismos vivos. Más preferiblemente, el punto de enturbiamiento no
20 supera los 53 °C. Los tensioactivos individuales que tienen un valor de HLB alto de 13,1 o más no tienen un punto de enturbiamiento tan bajo. Por lo tanto, se usa un segundo tensioactivo que tiene un punto de enturbiamiento inferior en combinación con el primer tensioactivo. Esto reduce el punto de enturbiamiento, pero también el HLB, es decir, las propiedades de disolución de aceite/grasa de la mezcla.

25 El valor de HLB resultante de una mezcla de dos tensioactivos se puede calcular fácilmente ((% en masa del tensioactivo 1 en la mezcla) x su HLB + (% en masa del tensioactivo 2 en la mezcla) x su HLB = HLB de la mezcla). Sin embargo, no es posible un cálculo tan sencillo del punto de enturbiamiento de una mezcla.

30 Como se ha mencionado anteriormente, el punto de enturbiamiento (PE) depende del HLB, pero también es una función de concentración de los tensioactivos y las sales. Más allá de cierta concentración crítica, el PE disminuye monotónicamente al aumentar la concentración de sal. Además, también se sabe que el efecto de añadir sales reducirá el valor efectivo de HLB del reactivo de clarificación, por lo que es necesario encontrar el equilibrio adecuado.

35 Por lo tanto, siempre se requiere una cierta cantidad de experimentación para encontrar el mejor compromiso entre un HLB deseado y un punto de enturbiamiento determinado (o entre un punto de enturbiamiento deseado y un HLB dado) para la elección de los tensioactivos y las sales utilizadas en la mezcla.

40 Sin embargo, como regla general, un valor de HLB relativamente bajo de aproximadamente 13,0 a aproximadamente 14 es suficiente cuando la proporción de aceite/grasa en la emulsión es baja, por ejemplo, alrededor del 1 % en peso. En este caso, los primeros tensioactivos pueden comprender la mayor cantidad de la mezcla de tensioactivos, y los segundos tensioactivos comprenden solo una pequeña cantidad de la mezcla de tensioactivos. Para las emulsiones con un mayor contenido de grasa, como la leche cruda con un contenido de
45 grasa de aproximadamente el 3,5 a aproximadamente el 4 % en peso o la nata con un contenido de grasa de hasta el 50 %, se requiere un mayor HLB, por ejemplo, de aproximadamente 14,5 a aproximadamente 15 para conseguir la clarificación en una solución transparente. En este caso, la cantidad de segundos tensioactivos en la mezcla será significativamente mayor que la cantidad de los primeros tensioactivos.

50 Ejemplos del primer tensioactivo que tiene un valor de HLB de aproximadamente 8,0 a aproximadamente 13,0 y un punto de enturbiamiento de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 45 °C son: Triton[®] X-114 (The Dow Chemical Company), una mezcla patentada de polioxietileno monoocilfenil éter con 7-8 unidades de oxietileno (Punto de enturbiamiento (PE): 23 °C, valor de HLB: 12,4), que es particularmente preferida, Unitol Hydol - 6 (C8E3; PE: 38-42 °C, valor de HLB: 11,5) y los siguientes tensioactivos patentados: Lutensol[®] TDA 6 (valor de HLB: 11,0, PE: 41 °C), Triton[®] X45 (valor de HLB: 9,6, PE: 38 °C), PLURAFAC[®] LF-400 (valor de HLB: 9,0, PE: 35 °C),
55 PLURAFAC[®] SL-42 (valor de HLB: 13,0, PE: 42 °C), IGEPAL[®] CA 620 (valor de HLB: 12,0, PE: 22 °C) e IGEPAL[®] CO-610 (valor de HLB: 12,6, PE: 26 °C).

60 Ejemplos del segundo tensioactivo que tiene un valor de HLB de aproximadamente 13,1 a aproximadamente 16,9 y un punto de enturbiamiento de aproximadamente 59 °C a aproximadamente 100 °C son: Walloxen ID 110 (Wall Chemie GmbH, Kempen, Alemania), un éter isodecílico de polioxietileno ("isodecicalcohol-11-poliglicol éter") (valor de HLB: 15,1, PE: 62-66 °C), que es particularmente preferido, Lanspec[®] EMP906C, un etoxilato de alcohol C13 patentado (valor de HLB: 13,5, PE: 68-72 °C) y Tergitol[®] 15-S-9 (The Dow Chemical Company), un etoxilato de alcohol secundario patentado (valor de HLB 13,3, PE: 60 °C) y los siguientes tensioactivos patentados: Triton[®] X 100 (valor de HLB: 13,5 PE: 65 °C), Brij[®] 35 (valor de HLB: 16,9, PE > 100 °C), Tween[®] 20 (valor de HLB: 16,7, PE:
65 95 °C), Tween[®] 80 (valor de HLB: 15,0, PE: 60 °C), y Nonidet[®] P40 (valor de HLB: 13,5, PE: 63-67 °C).

Como ya se ha indicado anteriormente, la relación en peso de los primeros tensioactivos a los segundos tensioactivos puede variar ampliamente, por ejemplo, de aproximadamente 1:6 a aproximadamente 6:1, más preferiblemente de aproximadamente 1:3 a aproximadamente 3:1 y de forma particularmente preferida de aproximadamente 1:2 a aproximadamente 2:1. La proporción de peso depende principalmente de la cantidad de
5 grasa en la emulsión, pero también de la cantidad de sal o sales en el reactivo y en la emulsión, lo que influye en la estabilidad y disolución, respectivamente, de las emulsiones y en otros componentes no grasos o no oleosos que pueden interferir con la clarificación.

La relación entre las sales y el peso combinado de los tensioactivos también puede variar ampliamente, en concreto,
10 de aproximadamente 0,5 mol de sal o sales por 100 g de tensioactivos totales a aproximadamente 2 mol de sal o sales por 100 g de tensioactivos totales.

La concentración total del primer tensioactivo o tensioactivos y el segundo tensioactivo o tensioactivos en el reactivo puede variar, por ejemplo, de aproximadamente 100 g/l a aproximadamente 500 g/l, más frecuentemente de
15 aproximadamente 160 g/l a aproximadamente 380 g/l, y en particular de aproximadamente 175 g/l a aproximadamente 275 g/l. La concentración total de los primeros tensioactivos puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 15 g/l o aproximadamente 25 g/l o aproximadamente 50 g/l o aproximadamente 75 g/l o aproximadamente 120 g/l o aproximadamente 180 g/l o aproximadamente 300 g/l o aproximadamente 430 g/l. La concentración total de los segundos tensioactivos puede estar dentro de los mismos intervalos.

El reactivo de la invención opcionalmente puede contener un agente tamponante además de las sales o, si el agente tamponante solo comprende sales, como las sales del reactivo de la invención. Un agente tamponante adecuado que solo comprende sales es, por ejemplo, Bentley Instruments, IBCM BactoKit 500 Component 1, que comprende borato de sodio decahidratado, carbonato de sodio y dihidrato de EDTA, que puede estar contenido en el reactivo en
20 una proporción de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 5 % en peso.

Además, el reactivo puede comprender uno o más colorantes fluorescentes.

El reactivo de la invención también puede contener una cantidad menor de componentes no esenciales, tales como
30 cantidades menores de disolventes orgánicos, por ejemplo, alcoholes, éteres, ésteres, cetonas y aldehídos o colorantes.

Por lo tanto, el reactivo puede consistir o puede consistir esencialmente en la sal o sales mencionadas y el primer y
35 segundo tensioactivos no iónicos y opcionalmente un tampón y uno o más colorantes fluorescentes.

Un reactivo de forma particularmente preferida de acuerdo con la invención comprende de aproximadamente 130 a
40 aproximadamente 150 g/l de isodeciloalcohol-11-poliglicoléter (Walloxen ID 110/80), de aproximadamente 65 a aproximadamente 75 g/l de Triton[®] X-114, de aproximadamente 110 a aproximadamente 130 g/l de formiato de amonio y, opcionalmente, un colorante fluorescente y tiene un punto de enturbiamiento de aproximadamente 51 °C a aproximadamente 53 °C.

La preparación del reactivo de la invención es simple, pero se debe respetar el siguiente orden: al principio, la sal y
45 opcionalmente la sal tamponante se añade al agua desionizada o destilada, si es necesario con calentamiento suave. A esa temperatura o después de enfriar a temperatura ambiente, se añade el segundo tensioactivo o tensioactivos y, a continuación, se añade el primer tensioactivo o tensioactivos. Si la mezcla aún está caliente cuando se añaden los tensioactivos, puede volverse turbia, pero al enfriarse a temperatura ambiente, la mezcla se convertirá en una solución transparente lista para usar.

El reactivo descrito anteriormente se usa para clarificar emulsiones de O/W en soluciones translúcidas o
50 transparentes.

En el método de la invención, el reactivo descrito anteriormente se añade a una emulsión en una cantidad
55 predeterminada con lo cual la mezcla obtenida se mantiene a temperatura ambiente o a una temperatura elevada hasta el punto de ebullición de la mezcla hasta que la emulsión se haya convertido en un líquido translúcido o transparente.

Como se ha mencionado anteriormente, el método de la invención se puede realizar con cualquier emulsión, como
60 emulsiones técnicas, por ejemplo, lubricantes refrigerantes, emulsiones domésticas, por ejemplo, detergentes para lavar platos, emulsión utilizada para cosméticos, productos sanitarios y productos farmacéuticos, por ejemplo, cremas faciales, lociones corporales y varias cremas farmacéuticas y emulsiones de alimentos y bebidas, por ejemplo, y otros productos lácteos.

La emulsión se puede diluir antes de añadir el reactivo clarificante, por ejemplo, si la concentración de aceite/grasa o
65 la concentración de otros componentes en la emulsión es demasiado alta y pudiera interferir con la clarificación y/o la medición del parámetro deseado, por ejemplo, el número de partículas/microorganismos en la emulsión.

La cantidad de reactivo necesaria para clarificar la emulsión a un líquido translúcido o transparente puede variar ampliamente y depende de una variedad de parámetros, como el tipo de aceite o grasa, la concentración de aceite o grasa, la concentración de electrolitos, la concentración de otras sustancias neutras, etc. Por lo general, está predeterminado por experimentos en serie preliminares en los que al principio se establece un rango aproximado de la cantidad necesaria y se prueban a continuación las cantidades en intervalos más pequeños. El experto en la materia está familiarizado con dichas pruebas de rutina. La concentración empleada debe ser lo más baja posible, si se realizan pruebas de microorganismos para asegurar su viabilidad o, al menos, su integridad.

Hay circunstancias en las que el reactivo de la invención puede clarificar la emulsión a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C), lo cual es muy deseable cuando se prueban los microorganismos, ya que en este caso se asegura su viabilidad o, al menos, su integridad. Sin embargo, a menudo la mezcla de emulsión y reactivo clarificante debe calentarse para su clarificación. Esto puede llegar hasta el punto de ebullición de la emulsión, si esta última no contiene ningún componente sensible al calor. La temperatura requerida depende en gran medida de la naturaleza específica de la emulsión, como en el caso discutido anteriormente para la cantidad de reactivo, y generalmente se requieren experimentos de rutina preliminares para encontrar la mejor temperatura y período de tiempo de reacción para una emulsión específica. En cualquier caso, la reacción se completa cuando la mezcla se ha clarificado completamente y se ha convertido en una solución transparente o translúcida.

La emulsión a clarificar puede o puede no contener partículas inorgánicas, orgánicas o biológicas que son insolubles en el medio acuoso después de la clarificación.

Una propiedad que puede medirse en una emulsión clarificada que no contiene partículas es, por ejemplo, el color de cualquier compuesto coloreado disuelto mediante espectroscopía UV/Vis.

Si hay partículas presentes, sus características, por ejemplo, su concentración, pueden ser mucho más fáciles o solo pueden medirse después de la clarificación de la emulsión por cualquier método analítico utilizado por la persona experta para las mediciones de partículas presentes en un medio que es un disolvente u otra solución clara.

Las emulsiones que contienen partículas biológicas, es decir, microorganismos (bacterias, levaduras, algas) y opcionalmente células somáticas, son de particular importancia en relación con la presente invención. Los microorganismos y opcionalmente las células somáticas pueden estar presentes en todo tipo de emulsiones en concentraciones extremadamente variables, como desde prácticamente cero (en productos recién esterilizados) o 1000 hasta digamos 20 millones de partículas biológicas (por ejemplo, en leche cruda) por ml. Dado que los microorganismos pueden estropear todo tipo de emulsiones, y aún más importante, las emulsiones de alimentos y bebidas, su determinación cuantitativa y cualitativa es de gran interés.

Sorprendentemente se descubrió que el presente método es útil en emulsiones que contienen microorganismos para ser medidos incluso si para la completa clarificación de la emulsión es necesario el calentamiento de la mezcla de emulsión y reactivo a aproximadamente 56,5 °C, o más preferentemente de aproximadamente 45 °C hasta aproximadamente 55 °C, durante un tiempo de hasta aproximadamente 20 minutos, como 12 minutos, preferiblemente hasta aproximadamente 10 minutos, y más preferiblemente hasta aproximadamente 2 minutos, como ocurre, por ejemplo, con la leche cruda.

Cabe esperar que una pequeña parte de los microorganismos pueda sufrir lisis en estas condiciones. Sin embargo, si después de medir el número de microorganismos en la emulsión clarificada de acuerdo con el método de la invención, existe una correlación lineal sobre el rango interesante de concentraciones con un método que se sabe que produce recuentos correctos, el método es válido y puede ser usado para una correcta determinación de la cantidad de células. Sorprendentemente, dicha correlación lineal se encontró efectivamente para el método de la presente invención cuando se probó la cantidad de microorganismos en una muestra de leche cruda.

La Figura 1 muestra la correlación entre los recuentos de microorganismos (unidad: rbi (recuento de bacterias individuales)/ μ l) realizada en una muestra de leche cruda mediante el método realizado por un instrumento automático BactoCount[®] (Bentley Instruments) (un método ya reconocido internacionalmente para la determinación rápida del total de bacterias en la leche cruda) y el método de acuerdo con la invención en donde la muestra de leche cruda se clarificó como se describe en el Ejemplo 2 y los microorganismos se contaron por medio de citometría de flujo. La correlación es excelente, lo que significa que cualquier pérdida de partículas de microorganismos (principalmente bacterianas), es decir, células, debido a la lisis es proporcional al número de microorganismos en la muestra y puede tenerse en cuenta calibrando el método.

La Figura 2 es un diagrama que muestra la correlación entre una determinación de recuentos de células somáticas en una muestra de leche cruda de acuerdo con el método de la presente invención como se describe en el Ejemplo 5 y de acuerdo con el método BactoCount[®] (Bentley Instruments). La correlación es excelente.

La Figura 3 es un diagrama que muestra la correlación entre una determinación de recuentos de células somáticas en una muestra de leche cruda de acuerdo con el método de la presente invención como se describe en el Ejemplo 6 y de acuerdo con el método BactoCount[®] (Bentley Instruments). La correlación es excelente.

Para la leche u otros productos lácteos, el reactivo de la invención tiene preferiblemente un punto de enturbiamiento igual o inferior a 55 °C, preferiblemente de aproximadamente 51 °C a aproximadamente 53 °C, y preferiblemente su primer tensioactivo no iónico es Triton[®] X-114, el segundo tensioactivo no iónico es isodeciloalcohol-11-poliglicoléter (Walloxen ID 110) y la sal es formiato de amonio.

Se puede incluir una sal tamponante en el reactivo, como se ha descrito anteriormente.

Como se ha mencionado anteriormente, la cantidad de reactivo añadido a una muestra de emulsión para una clarificación completa generalmente debe establecerse mediante experimentos de rutina en serie. Mediante dichos experimentos se descubrió que la cantidad de reactivo añadido a 1 ml de leche cruda contiene ventajosamente una cantidad total de primer tensioactivo o tensioactivos, preferiblemente Triton[®] X-114, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 320 mg, de forma particularmente preferida de aproximadamente 190 mg a aproximadamente 230 mg, una cantidad total de segundo tensioactivo o tensioactivos, preferiblemente isodeciloalcohol-11-poliglicoléter, de aproximadamente 280 mg a aproximadamente 530 mg, de forma particularmente preferida de aproximadamente 400 mg a aproximadamente 450 mg, y una cantidad molar total de aproximadamente 1 mmol a aproximadamente 15 mmol, de forma particularmente preferida de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5 mmol, de dichas una o más sales, preferiblemente formiato de amonio, sales tamponantes no incluidas. Esta cantidad puede estar contenida en 3 ml de reactivo.

Además, el pH de la mezcla de muestra de emulsión y reactivo generalmente debe controlarse para que esté en un rango de pH de aproximadamente neutro a aproximadamente 9,5. El valor de pH puede ajustarse antes, mientras o después de añadir el reactivo. El ajuste del pH se puede conseguir mediante la selección de sal o sales apropiada (por ejemplo, ácidas o básicas) y su concentración en el reactivo, añadiendo un tampón adecuado a la emulsión y/o añadiendo un tampón adecuado al reactivo. Los tampones adecuados para los intervalos de pH anteriores son bien conocidos por el experto en la materia.

A la hora de detectar microorganismos en una emulsión, en particular en la leche y los productos lácteos, se pueden añadir una o más enzimas proteolíticas antes, mientras o después de que se añada el reactivo para destruir agregados de proteínas más grandes que pueden interferir con la medición. Las enzimas proteolíticas y sus métodos de uso son bien conocidos por el experto en la materia.

Además, se pueden añadir uno o más colorantes fluorescentes a la emulsión antes, mientras o después de añadir el reactivo, si los microorganismos se detectan mediante un método óptico que requiere tinción de fluorescencia. Los colorantes de fluorescencia adecuados y su uso son bien conocidos por el experto en la materia.

Como se ha mencionado anteriormente, la naturaleza y/o la cantidad de partículas inorgánicas, orgánicas o biológicas insolubles en la emulsión clarificada se pueden determinar por cualquier método adecuado, incluidos métodos químicos. Los métodos preferidos para la detección cualitativa y cuantitativa de partículas son los métodos ópticos, físicos y bioquímicos. Incluyen análisis mediante ICP (plasma acoplado inductivamente), analizadores de inyección de flujo, citómetros de flujo, espectrometría (visible, infrarroja, UV, fluorescencia), cámaras CCD, microscopía de luz y microscopía de fluorescencia y PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Estos métodos son bien conocidos por el experto en la materia.

Un kit para producir el reactivo de la invención *in situ* comprende la una o más sales, el uno o más primeros tensioactivos, el uno o más segundos tensioactivos y opcionalmente sal tamponante en al menos dos contenedores separados. Preferiblemente, cada reactivo está contenido en un contenedor separado. El kit también puede incluir instrucciones para la preparación del reactivo y para su uso en un método específico para clarificar una emulsión, por ejemplo, leche u otro producto lácteo.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención sin la intención de limitar el alcance de la misma.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Preparación de un reactivo para clarificar una emulsión de leche cruda

Se disolvieron 10 g de formiato de amonio para análisis (Aldrich) en 60 ml de agua estéril desionizada interna con agitación a temperatura ambiente. Se añadieron 12 g de Walloxen[®] ID 110 (80 % en agua) y posteriormente 6 g de Triton X-114. La solución era transparente a temperatura ambiente.

El punto de enturbiamiento se determinó experimentalmente. El reactivo se calentó hasta que se volvió turbio. A continuación se enfrió hasta que el reactivo se volvió transparente nuevamente. La temperatura a la que el reactivo cambió de transparente a turbio se registró y se definió como el punto de enturbiamiento (PE).

Se encontró que el PE era de 52-53 °C.

El valor de HLB se calculó en aproximadamente 15.

Ejemplo 2 - Clarificación de una muestra de leche cruda y recuento bacteriano

5 Se mezclaron una muestra de 1 ml de leche cruda y 3 ml del reactivo preparado en el Ejemplo 1, y posteriormente se añadieron 2,0 ml de reactivo Bentley IBCM BactoKit 500 (tampón + enzima + colorante fluorescente) a 1 ml de la mezcla clarificada. La mezcla resultante se incubó a 50 ± 5 °C durante 10 minutos y se sonicó durante 16 segundos.

10 El número de células (principalmente bacterias) se determinó por citometría de flujo y se comparó con el resultado determinado en otra muestra de la misma leche por medio de un instrumento automático BactoCount[®] (Bentley Instruments). El resultado se muestra en la Figura 1.

Ejemplo 3 - Clarificación de una muestra de leche cruda y recuento bacteriano e identificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

15 Se aclaró una muestra de 1 ml de leche cruda como se describe en el Ejemplo 2, sin embargo, no se añadió reactivo proteolítico.

20 A continuación, se extrajo el ADN total de la leche clarificada y se sometió a recuento bacteriano por PCR e identificación por medio de un protocolo convencional (ensayo de PCR Thermo Scientific PathoProof[®] Mastitis Complete-12).

25 La clarificación completa de la leche en este método es de gran ventaja, ya que con este método no se deben eliminar los coágulos ni la grasa después de la centrifugación. La filtración de las muestras también es mucho más fácil.

Ejemplo 4 - Preparación de un reactivo para clarificar una emulsión de leche cruda

30 Se disolvieron 10 g de formiato de amonio para análisis (Aldrich) en 60 ml de agua estéril desionizada interna con agitación a temperatura ambiente. Se agregaron 12 g de Walloxen[®] ID 110 (80 % en agua), a continuación 6 g de Triton X-114 y finalmente 10 µg de colorante fluorescente de fenantridinio. La solución era transparente a temperatura ambiente. El valor del pH fue de aproximadamente 7,0.

Ejemplo 5 - Clarificación de una muestra de leche cruda y cuantificación rápida de células somáticas

35 Se mezcló 1 ml de leche cruda con 1 ml del reactivo del Ejemplo 4 y 1 ml de una solución de colorante (Bentley IBCM BactoKit Component 3), y después de 10 segundos de incubación a temperatura ambiente, se determinó el recuento de células somáticas por citometría de flujo y se comparó con el resultado determinado en otra muestra de la misma leche mediante el método BactoCount[®] (Bentley Instruments). El resultado se muestra en la Figura 2.

40 **Ejemplo 6 - Clarificación de una muestra de leche cruda y cuantificación rápida de células somáticas**

45 Se mezcló 1 ml de leche cruda con 3 ml del reactivo del Ejemplo 4 y se incubó a 54 °C durante 3 minutos hasta la clarificación completa (transparencia).

50 Se incubaron 1 ml de la mezcla clarificada anterior y 2 ml de solución de colorante al 50 % (Bentley IBCM BactoKit Component 3) en agua durante 10 segundos a temperatura ambiente. A continuación, el recuento de células somáticas se determinó mediante citometría de flujo y se comparó con el resultado determinado en otra muestra de la misma leche mediante el método BactoCount[®] (Bentley Instruments). El resultado se muestra en la Figura 3.

Ejemplo 7 - Preparación de un reactivo para clarificar el lubricante refrigerante

55 Se añadieron 9,8 g de cloruro de amonio a 45 ml de agua destilada con calentamiento suave a 40 °C. A continuación se añadieron 2,3 g de Lanspec[®] EMP906 y posteriormente 5 g de Triton X-114. Después de enfriar a temperatura ambiente, se obtuvo una solución transparente.

Ejemplo 8 - Clarificación de una emulsión de lubricante refrigerante que contiene microorganismos

60 El reactivo del Ejemplo 7 se añadió a una muestra de emulsión de lubricante refrigerante contaminada con microorganismos en una relación 1:1 en volumen. La emulsión se convirtió en un líquido amarillo claro inmediatamente después de la adición del reactivo.

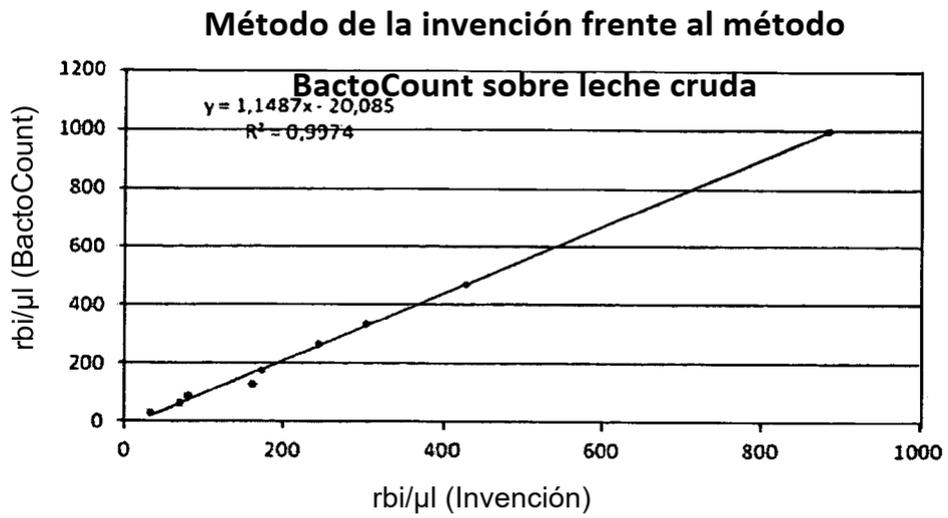
Los microorganismos se contaron por medio de un citómetro de flujo.

REIVINDICACIONES

1. Un reactivo para clarificar emulsiones de aceite/grasa en agua (O/W) que comprende una solución acuosa de una o más sales que tienen una solubilidad en agua de al menos aproximadamente 1 mol/l, uno o más primeros tensioactivos no iónicos que tienen un valor de HLB de 8,0 a 13,0 y un punto de enturbiamiento de 0 °C a 45 °C y uno o más segundos tensioactivos no iónicos que tienen un valor de HLB de 13,1 a 16,9 y un punto de enturbiamiento de 59 °C a 100 °C, en donde el reactivo tiene un punto de enturbiamiento igual o inferior a 57 °C, **caracterizado por que** la proporción de la cantidad de sal o sales a tensioactivo o tensioactivos es de 0,25 mol a 2 mol por 100 g de tensioactivo o tensioactivos totales y la concentración de la sal o sales en el reactivo es de 0,5 a 12 mol/l.
2. El reactivo de la reivindicación 1, en donde la una o más sales no comprenden Na^+ en una cantidad superior a 154 mmol/l ni K^+ en una cantidad superior a 4 mmol/l.
3. El reactivo de la reivindicación 1 o 2, en donde el catión de la una o más sales es NH_4^+ .
4. El reactivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anión o aniones de la una o más sales se seleccionan entre cloruro, fluoruro, nitrato, formiato y acetato.
5. El reactivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la una o más sales se seleccionan entre cloruro de amonio y formiato de amonio.
6. El reactivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la sal comprende una mezcla tamponante de borato de sodio decahidratado, carbonato de sodio y dihidrato de EDTA.
7. El reactivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la proporción del uno o más primeros tensioactivos no iónicos al uno o más segundos tensioactivos no iónicos es de 6:1 a 1:6, preferiblemente de 1:3 a 3:1 y en particular de 1:2 a 2:1 en peso.
8. El reactivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el uno o más primeros tensioactivos se seleccionan entre una mezcla de éteres de polioxi-etileno mono-octilfenilo con 7-8 unidades de oxietileno.
9. El reactivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el uno o más segundos tensioactivos se seleccionan entre isodecil-11-poliglicoléter.
10. El reactivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la concentración total del primer tensioactivo o tensioactivos y el segundo tensioactivo o tensioactivos en la solución acuosa es de 100 g/l a 500 g/l.
11. Uso de un reactivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para clarificar una emulsión de O/W.
12. Un método para clarificar una emulsión de O/W, en donde se añade un reactivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 a la emulsión en una cantidad predeterminada y la mezcla del reactivo y la emulsión se mantiene a temperatura ambiente o se calienta a una temperatura elevada hasta aproximadamente el punto de ebullición de la mezcla y se mantiene durante un período de tiempo suficiente a la temperatura, hasta que la emulsión se ha clarificado y se ha convertido en un líquido translúcido o transparente.
13. El método de la reivindicación 12, en donde la emulsión contiene partículas inorgánicas, orgánicas o biológicas que son insolubles en el líquido transparente.
14. El método de la reivindicación 13, en donde se añade el reactivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, las partículas son partículas biológicas y en donde en el método no se excede una temperatura de 56,5 °C.
15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en donde la emulsión se selecciona entre emulsiones técnicas, emulsiones domésticas, emulsiones utilizadas en productos cosméticos y/o sanitarios y/o farmacéuticos y emulsiones de alimentos/bebidas.
16. El método de la reivindicación 15, en donde la emulsión es una emulsión de comida/bebida seleccionada de la leche y productos lácteos.
17. El método de la reivindicación 16, en donde el método involucra una temperatura máxima en el rango de 37 °C a 56,5 °C durante un período máximo de tiempo de 20 minutos.
18. El método de la reivindicación 17, en donde el método implica una incubación a una temperatura de 45 a 55 °C durante un período máximo de tiempo de 10 minutos.

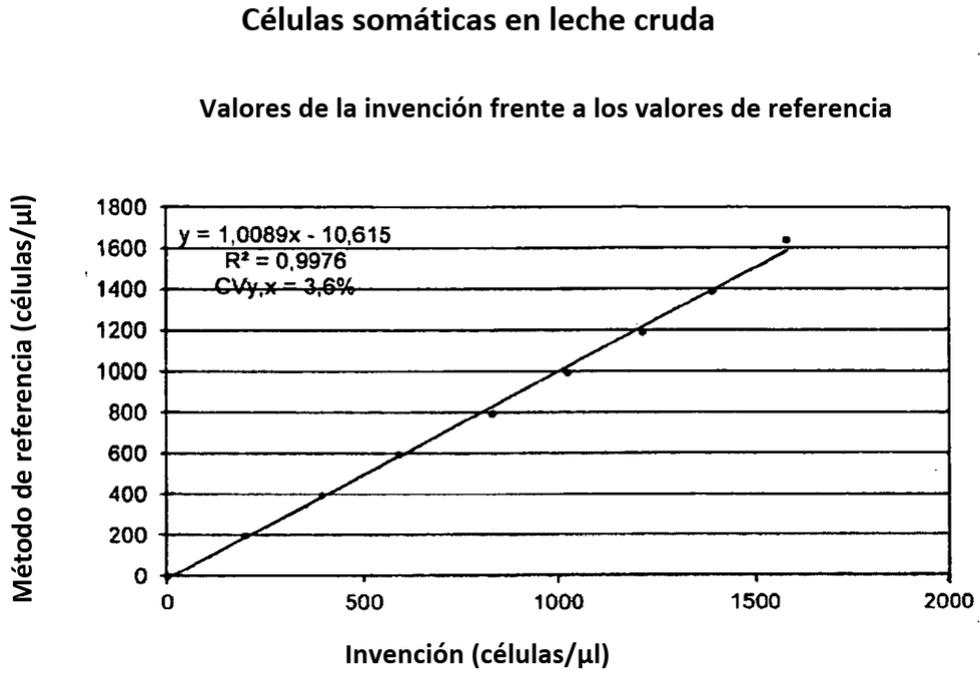
19. El método según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en donde el valor de HLB del reactivo es de 10 o superior para obtener una solución translúcida a transparente, y de 13 o superior para obtener una solución transparente.
- 5 20. El método de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, en donde el reactivo tiene un punto de enturbiamiento igual o inferior a 55 °C, preferiblemente de 51 °C a 53 °C, el primer tensioactivo no iónico es una mezcla de polioxietileno monooctilfenil éteres con 7-8 unidades de oxietileno, el segundo tensioactivo no iónico es isodeciloalcohol-11-poliglicoléter y la sal es formiato de amonio.
- 10 21. El método de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 20, en donde el reactivo añadido a 1 ml de leche contiene una cantidad total de primer tensioactivo o tensioactivos de 100 mg a 320 mg, de forma particularmente preferida de 190 mg a 230 mg, una cantidad total de segundo tensioactivo o tensioactivos de 280 mg a 530 mg, de forma particularmente preferida de 400 mg a 450 mg, y una cantidad molar total de 1 mmol a 15 mmol, de forma particularmente preferida de 5,5 a 6,5 mmol, de dicha una o más sales, no incluidas las sales tamponantes.
- 15 22. El método de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21, en donde el pH de la leche o el producto lácteo se ajusta a un pH de 7,0 a 9,5 antes, mientras o después de que se añade el reactivo.
- 20 23. El método de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 22, en donde también se añaden una o más enzimas proteolíticas antes, mientras o después o dentro del reactivo.
24. El método de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 23, en donde también se añaden uno o más colorantes fluorescentes antes, mientras o después o dentro del reactivo.
- 25 25. El método de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 24, en donde se aplica un tratamiento de sonicación a la emulsión o a la mezcla de la emulsión y el reactivo.
26. El método de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 25, en donde la naturaleza y/o la cantidad de partículas inorgánicas, orgánicas o biológicas insolubles se determina por métodos ópticos o físicos.
- 30 27. El método de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 26, en donde después de la clarificación de la emulsión, el ADN contenido en la misma se extrae y se somete a reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- 35 28. Un kit de partes para preparar el reactivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para usar en el método de las reivindicaciones 19 y 20 *in situ*, que comprende dicha una o más sales, dicho uno o más primeros tensioactivos, dicho uno o más segundos tensioactivos y opcionalmente dicha sal tamponante en al menos dos contenedores separados.
- 40 29. El kit de partes de la reivindicación 28, en donde cada reactivo está contenido en un contenedor separado.

Fig. 1



Prueba N.º	Invención	BactoCount	Log	
			Invención	BactoCount
1	72	62	1,85	1,79
2	173	177	2,24	2,25
3	303	335	2,48	2,53
4	886	1000	2,95	3,00
5	34	31	1,53	1,49
6	82	87	1,91	1,94
7	163	129	2,21	2,11
8	246	269	2,39	2,43
9	429	471	2,63	2,67

Fig. 2

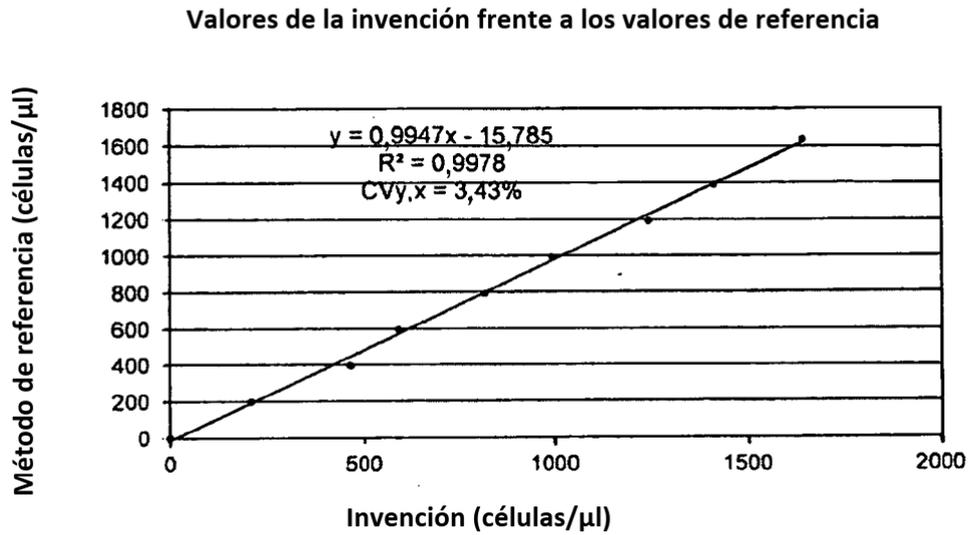


Método de referencia: Método BactoCount® (Bentley Instruments)

Invención (células/μl)	Método de referencia (células/μl)
0	0
199	199
394	397
591	596
831	795
1025	993
1217	1192
1393	1390
1582	1639

Sy,x 29,0002718
 Media 800,111111
 CV 3,62453056

Fig. 3



Método de referencia: Método BactoCount® (Bentley Instruments)

Inventión (células/μl)	Método de referencia (células/μl)
0	0
208	199
465	397
590	596
819	795
996	993
1247	1192
1415	1390
1642	1639

Sy,x 27,4543969
 Media 800,111111
 CV 3,43132304