



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 162 552**

② Número de solicitud: 009900776

⑤ Int. Cl.⁷: C12Q 1/04

/(C12Q 1/04

C12R 1:66)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **14.04.1999**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.12.2001**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.12.2001

⑦ Solicitante/s: **UNIVERSIDADE DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA.**
Centro de Innovación e Transferencia de
Tecnoloxía
Avda. das Ciencias s/n
15706 Santiago de Compostela, A Coruña, ES

⑦ Inventor/es: **Fente Sampayo, Cristina A.;**
Jaimez Ordaz, Judith;
Vázquez Belda, Beatriz Isabel;
Franco Abuín, Carlos Manuel y
Cepeda Sáez, Alberto

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Método de detección en medio de cultivo de cepas de hongos *Aspergillus* productoras de aflatoxinas mediante la adición de β -ciclodextrinas.**

⑤ Resumen:

Método de detección en medio de cultivo de cepas de hongos *Aspergillus* productoras de aflatoxinas mediante la adición de β -ciclodextrinas, particularmente la 2,6-ortodimetil β -ciclodextrina, como aditivo para los medios de cultivo de hongos con objeto de incrementar la fluorescencia natural de las aflatoxinas, permitiendo la detección visual directa de esas micotoxinas en forma de un anillo de fluorescencia que rodea la colonia, y conocer la existencia de cepas aflatoxigénicas en el alimento, ambiente o superficie.

ES 2 162 552 A1

DESCRIPCION

Método de detección en medio de cultivo de cepas de hongos *Aspergillus* productoras de aflatoxinas mediante la adición de β -ciclodextrinas.

Las aflatoxinas (Af) B₁, B₂, G₁ y G₂ son sustancias carcinogénicas producidas por hongos pertenecientes a las especies *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, en condiciones adecuadas de humedad y temperatura y sobre gran variedad de substratos alimentarios.

La metodología tradicional para conocer la capacidad aflatoxigénica de las cepas de estos hongos implica el cultivo de las cepas en medios de cultivo adecuados (líquidos o sólidos) y la posterior extracción y análisis cromatográfico de las aflatoxinas producidas. Como substratos utilizados habitualmente para la producción de aflatoxinas destacamos el medio con extracto de levadura, medios de arroz o maíz, o medios con extracto de coco. Las cepas deben de ser cultivadas en esos medios durante 10 o más días antes de proceder a la extracción de las micotoxinas producidas.

Cuando es muy alto el número de cepas a testar es necesario un método más simplificado por lo que se han desarrollado muchos medios de cultivo para la detección directa de cepas aflatoxigénicas. Se trata de medios de cultivo más o menos complicados con aditivos que incrementan la capacidad de producir estas micotoxinas con el fin de conseguir la detección visual directa, bajo luz UV, del anillo de fluorescencia que rodea las colonias productoras de aflatoxinas. Así, se han usado para este propósito medios conteniendo azúcares, sales, extracto de cacahuets, licor de maíz o extracto de coco (Hara, S.; Fennell, D.I. y Hesseltine, C.W. (1974). "Aflatoxin-producing strains of *Aspergillus flavus* detected by fluorescence of agar medium under ultraviolet light." *Appl. Microbiol.*: 1118-1123; Lin, M.T. y Dianese, J.C. (1976). "A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp." *Phytopathology*, 66: 1466-1469; Torrey, G.S. y Marth, E.H. (1976). "Silica gel medium to detect molds that produce aflatoxin." *Appl. Environm. Microbiol.*, 32 (3): 376-380; Lemke, P.A.; Davis, N.D., Iyer, S.K. y Creech, G.W. (1989). "Direct visual detection of aflatoxin synthesis by micocolonies of *Aspergillus* Species." *Appl. Environm. Microbiol.*, 55 (7): 1808-1810). Todos los métodos descritos en estas publicaciones suponen la utilización de medios de cultivo específicos para la producción de aflatoxinas y que no pueden utilizarse para el recuento total de mohos y levaduras. Además, salvo en el caso del método descrito por Lemke et al. (5 días), son necesarios por lo menos 10 días de incubación para poder llegar al diagnóstico de la cepa en cuestión.

La fluorescencia natural de las aflatoxinas se debe al hecho de que se trata de estructuras pentaheterocíclicas oxigenadas con alto grado de insaturación. Las ciclodextrinas son moléculas de diferentes tamaños que contienen de 6 a 8 unidades de glucosa unidas por enlaces α (1-4), disponibles comercialmente y con propiedades químicas descritas en la literatura científica. Estos oligómeros son capaces de incluir en su ca-

vidad un gran número de moléculas orgánicas e inorgánicas y, en el campo que nos ocupa, la excitación de la fluorescencia natural de las aflatoxinas ha sido ampliamente estudiada por los autores de la presente invención (Vázquez, M.L.; Cepeda, A.; Prognon, P.; Mahuzier, G. y Blais, J. (1991). "Cyclodextrins as modifiers of the luminiscence characteristics of aflatoxins." *Anal. Chim. Acta*, 255: 343-350; Cepeda, A., Franco, C.M.; Fente, C.A.; Vázquez, B.I.; Rodríguez, J.L., Prognon, P. and Mahuzier, G. (1996). "Post-column excitation of aflatoxins using cyclodextrins in liquid chromatography for food analysis". *Journal of Chromatography A*, 721 69-74; Franco, C.M.; Fente, C.A.; Vázquez, B.I.; Cepeda, A.; Mahuzier, G., Prognon, P. (1998) "Interaction between cyclodextrines and aflatoxines Q1, M1 and P1: fluorescence and chromatographic studies." *J. Chromatography A*, 815 21-29.: B.I. Vázquez, C.A. Fente, C.M. Franco, A. Cepeda, G. Mahuzier and P. Prognon. (1999). "Preliminary study on fluorimetry detection of aflatoxins Q1, P1 and B1 using heptakis-di-*o*-methyl- β -cyclodextrin as pot-column HPLC reagent". *Analytical Communication*, 36, 5-7.). Los resultados de trabajos anteriores mostraron que la 2,6-ortodimetil β -ciclodextrina presenta una cavidad idónea para la formación de complejos de inclusión con las aflatoxinas lo que provoca un aumento muy importante de la respuesta fluorescente de estas moléculas, sobre todo de las aflatoxinas B₁ y G₁.

En la presente invención, esta capacidad de las ciclodextrinas de formar complejos de inclusión ha sido adaptada para la visualización directa de la fluorescencia debida a las aflatoxinas producidas por cepas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*. Se propone la utilización de las ciclodextrinas (en concreto de la 2,6-ortodimetil β -ciclodextrina, aunque también se puede utilizar la β -ciclodextrina, pero con resultados peores) como aditivo para los medios de cultivo de hongos con objeto de incrementar la fluorescencia natural de las aflatoxinas, que puedan producir los hongos cultivados en esos medios de cultivo, de forma que sea posible la detección visual directa en forma de un anillo de fluorescencia que rodea la colonia.

Las ventajas que suponen la utilización de este aditivo en los medios de cultivo se resumen en:

1. Posibilidad de utilización de los medios de cultivo que tradicionalmente se utilizan para el recuento total de mohos y levaduras en alimentos, realizando la adición de la ciclodextrina en el momento de su rehidratación para su posterior esterilización y distribución en placas Petri. Al utilizar este tipo de medios adicionados con ciclodextrina los resultados, en cuanto a recuento total de mohos y levaduras, no difieren de los obtenidos con los medios utilizados habitualmente y es posible, al mismo tiempo que se realiza esto, conocer la posible existencia de cepas aflatoxigénicas en el alimento, ambiente o superficie de que se trate.

2. Posibilidad de utilización de medios de cultivo tradicionales para hongos, realizando la adición de la ciclodextrina en el momento de su rehidratación para su posterior esterilización y distribución en placas Petri, para testar la capaci-

dad aflatoxigénica de cepas del género *Aspergillus*, sin necesidad de disponer de medios de cultivo más o menos complicados y que sólo son útiles para ese fin.

3. Dada la capacidad de la 2,6-ortodimetil β -ciclodextrina de exaltación de la fluorescencia natural de las aflatoxinas no son necesarios más de 3 o, sólo en algunos casos, 5 días de incubación para lograr la visualización directa, bajo luz UV de 365 nm, del anillo de fluorescencia que rodea a las cepas productoras.

Técnica experimental

Medios de cultivo

A modo de ejemplo de medios de cultivo para hongos a los que se les puede adicionar las ciclodextrinas, se citarán dos, que son los más usados para el recuento total de mohos y levaduras. Así, se pueden utilizar los medios de cultivo Sabouraud glucosado (disponible comercialmente, OXOID o de otra marca suministradora), suplementado o no con oxitetraciclina y con Rosa de Bengala (**Jarvis, B. (1973)**. "Comparison of an improved rose bengal-chlortetracycline agar with other media for the selective isolation and enumeration of moulds and yeast in foods." *J. Appl. Bacteriol.*, 36: 723-727). o el medio Yeast Extract Agar. Estos medios serán además suplementados con 2,6-ortodimetil β -ciclodextrina (WACKER u otra empresa suministradora, Munich, Germany). Composición de los medios de cultivo

1) Agar Sabouraud glucosado con oxitetraciclina

* Peptona	10,0 g
* Glucosa	40,0 g
* Agar	15,0 g
* heptakis-di-O-metil- β -ciclodextrina	3,0 g
* Agua destilada	Hasta 1000,0 mL
* Oxitetraciclina (Pfizer)	50,0 mg

Preparación: Se utiliza agar Sabouraud glucosado comercial, con todos los ingredientes ya mezclados, salvo la 2,6-ortodimetil β -ciclodextrina. Se disuelven 65 g de la mezcla comercial y 3 g de la ciclodextrina en agua destilada y se enrasa hasta un litro con agua destilada. Se esteriliza a 121°C durante 15 minutos. Una vez estéril, se enfría a 50°C y se añade (facultativo) la oxitetraciclina. Se mezcla y se distribuye en placas.

2) Agar Sabouraud glucosado con oxitetraciclina y Rosa de Bengala

Composición: La misma que la anterior con la incorporación de 35 mg de Rosa de Bengala, antes de esterilizar.

3) Agar extracto de levadura (YES)

* Extracto de levadura (comercial)	20,0 g
* Sacarosa	125,0 g
* Agar	20,0 g
* heptakis-di-o-metil- β -ciclodextrina	3,0 g
* Agua destilada	Hasta 1000,0 mL

Preparación: Se disuelven los componentes en agua destilada y se enrasa hasta un litro con agua destilada. Se esteriliza a 121°C durante 15 minutos. Una vez estéril, se enfría a 50°C. Se mezcla y se distribuye en placas.

Procedimientos en los que se pueden utilizar los medios de cultivo antes descritos

1) Recuento total de mohos y levaduras

Los medios de cultivo antes descritos pueden ser usados para el recuento total de mohos y levaduras en ambientes, superficies y alimentos, siguiendo los procedimientos generales que se emplean para dicho fin. A modo de ejemplo, se detallan algunos a continuación.

Se ha comprobado que no existen diferencias significativas en los resultados obtenidos al utilizar los medios de cultivo con y sin el suplemento de 2, 6-ortodimetil β -ciclodextrina.

Muestreo de ambientes

Para el muestreo de las esporas o propágulos fúngicos presentes en ambientes se podrán utilizar los métodos gravimétricos que se basan en la sedimentación de las partículas suspendidas en el aire por la acción de la gravedad sobre una superficie horizontal, placas de Petri con los medios de cultivo adecuados, durante un tiempo determinado, y a distintas alturas. Los resultados obtenidos por este método se expresan en unidades formadoras de colonia por placa (u.f.c./placa), fijando previamente el tiempo de exposición.

También se podrán usar métodos volumétricos como el que consiste en hacer pasar un volumen determinado de aire por un medio de cultivo sobre el que se realizan recuentos de organismos vivos (**Collins, C. M. y Lyne, P.M. (1989)**. *Métodos microbiológicos*. Ed. Acribia. Zaragoza.); los sistemas basados en la toma de un volumen determinado de aire cuyos microorganismos se depositan en la superficie de una placa de agar (**Ligugnana, R. y Whittard, L. (1982)**. "Proposals for sampling routines and the interpretation of results of microbiological testing of air and surfaces." *Procedures and Biological Informations*, 80:1-16; **Ligugnana, R. y Fung, D.Y.C. (1990)**. "Training of food and dairy staff for microbiological air and surface hygiene." *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, 3 (10):130-135) o el que consiste en hacer burbujear un volumen determinado de aire a través de agua estéril que luego se usa como inóculo para sembrar en placas de recuento (**Lück, H. (1987)**. *Control de calidad en la industria lactológica*. En "Microbiología lactológica, vol II, Microbiología de los productos lácteos". Robinson, R.K. Ed. Acribia S.A. Zaragoza.).

Muestreo de superficies

Se podrá usar la técnica de contacto con placa Rodac con medios de cultivo específicos para el recuento de mohos y levaduras (**Ottaviani, F. y Fpanceschetti, E. (1980)**. "Microbial hazards in food processing: a program of environmental food-plant survey by S.A.S. (Surface Air System)". *Proceedings of World Congress Foodborne Infections and Intoxications*. Berlin. **Ligugnana, R. y Whittard, L. (1982)**. "Proposals for sampling routines and the interpretation of results of microbiological testing of air and sur-

faces." *Procedures and Biological Informations*, 80:1-16; **Lück, H.** (1987). "Control de calidad en la industria láctea". En *Microbiología lactológica*, vol II, **Microbiología de los productos lácteos**. Robinson, R.K. Ed. Acribia S.A. Zaragoza).

Método del papel adhesivo transparente libre de sustancias antimicrobianas que se pega a la superficie a examinar, se separa y se presiona ligeramente sobre la superficie del medio de cultivo (**Lück, H.** (1987). "Control de calidad en la industria láctea". En *Microbiología lactológica*, vol II, *Microbiología de los productos lácteos*. Robinson, R.K. Ed. Acribia S.A. Zaragoza).

Lavado de una superficie con un líquido estéril realizando el recuento posterior de los microorganismos del líquido. (**Lück, H.** (1987). "Control de calidad en la industria láctea". En *Microbiología lactológica*, vol II, *Microbiología de los productos lácteos*. Robinson, R.K. Ed. Acribia S.A. Zaragoza, **Collins, C.M.** y **Lyne, P.M.** (1989). *Métodos microbiológicos*. Ed. Acribia. Zaragoza).

Frotado de una superficie delimitada con una torunda de algodón estéril humedecida con una solución de lavado llevándola después a una solución de lavado que se examina por recuento en placas con los medios adecuados (**Lück, H.** (1987). "Control de calidad en la industria láctea". En *Microbiología lactológica*, vol II, *Microbiología de los productos lácteos*. Robinson, R.K. Ed. Acribia S.A. Zaragoza; **Collins, C. M.** **Lyne, P.M.** (1989). *Métodos microbiológicos*. Ed. Acribia. Zaragoza).

Los resultados de este tipo de muestreos se expresan en unidades formadoras de colonia por unidad de superficie muestreada (u.f.c./cm²).

Muestreo de alimentos

Las técnicas de muestreo serán diferentes según la naturaleza física del producto a analizar (líquidos, sólidos). Debe llevarse a cabo un adecuado muestreo y procesado de las muestras con el fin de poder establecer de forma adecuada el conteo de las u.f.c./g o u.f.c./mL. Los propágulos fúngicos generalmente no se distribuyen de forma homogénea en los substratos y por ello el tamaño de la muestra debe ser lo más grande posible. Si los alimentos no están enmohecidos, los recuentos indican el nivel de contaminación por hongos viables u otras formas de espora. Pero si los hongos presentan crecimiento micelar, puede incrementarse el recuento por fragmentación de las hifas durante la homogeneización, el grado de fragmentación depende de la técnica de homogeneización. Además a menudo las especies de hongos esporulan en diferentes grados por lo que es difícil la interpretación de los resultados (**Hartog, B.J.** (1984). "The detection and quantification of fungi in food". En *Introduction to food-borne fungi*. Samson, R.A.; Hoekstra, E.S. y Van Oorschot, C.A.N. 2^a Ed. Centraalbureau Voor Schimmelcultures. Baarn.).

Cuando se pretende examinar solamente la superficie de los alimentos. se pueden utilizar las técnicas descritas para el muestreo de superficies: contacto con placa Rodac, método del papel adhesivo, lavado de la superficie con un líquido estéril o frotado de una superficie delimitada con

una torunda de algodón.

Si lo que se pretende es analizar la micoflora contaminante del interior de alimentos, previamente hay que esterilizar la superficie químicamente o bien eliminar la superficie asépticamente.

Para la preparación de la muestra se usan técnicas de homogeneización peristáltica, (**Jarvis, B.; Seiler, D.A.L.; Ould, A.J.L. y Willians, A.P.** (1983). "Observations on the enumerations of moulds in food and feedingstuffs." *J. Appl. Bacteriol.*, 55: 325-336).

Las soluciones usadas para la homogeneización de las muestras pueden ser salinas con (**Jarvis, B.** (1973). "Comparison of an improved rose bengal-chlortetracycline agar with other media for the selective isolation and enumeration of moulds and yeast in foods." *J. Appl. Bacteriol.* 36: 723-727.) o sin (**Vadillo, S., Paya, M.J., Cutuli, M.T. y Suarez, G.** (1987_a). "Raw milk mycoflora". *Milchwissenschaft*, 42 (1): 20-22; **Vadillo, S.; Paya, M.J.; Cutuli, M.T. y Suarez, G.** (1987_b). "Micoflora of milk after several types of pasteurization." *Le Lait*, 67 (2): 265-273.) o sin Tween 80 como agente dispersante, entre otras.

Se emplean métodos de recuento total en placa de agar a partir de la serie de diluciones decimales del producto. Son métodos usados tradicionalmente en bacteriología.

En cuanto a los medios de cultivo actualmente se utilizan los medios adicionados con antibióticos. Entre los antibióticos más usados están la oxitetraciclina, clortetraciclina, bencilpenicilina o el sulfato de estreptomycin.

Para evitar el crecimiento expansivo de algunos hongos Jarvis (1973) (**Jarvis, B.** (1973). "Comparison of an improved rose bengal - chlortetracycline agar with other media for the selective isolation and enumeration of moulds and yeast in foods." *J. Appl. Bacteriol.* 36: 723-727) propuso la adición a los medios de cultivo de 50 µg/mL de Rosa de Bengala. No obstante, su uso puede inhibir algunas levaduras (Mossel y col., 1975).

Según la bibliografía consultada, no existe un consenso entre los micólogos de alimentos en cuanto al medio de cultivo idóneo para la enumeración de hongos y levaduras en alimentos.

Entre los más comúnmente usados están el agar Sabouraud glucosado (**Vadillo, S., Paya, M.J.; Cutuli, M.T. y Suarez, G.** (1987_a). "Raw milk mycoflora". *Milchwissenschaft*, 42 (1): 20-22. **Vadillo, S.; Paya, M.J.; Cutuli, M.T. y Suarez, G.** (1987_b). "Micoflora of milk after several types of pasteurization." *Le Lait*, 67 (2): 265-273; **Paya, M.J. y Suarez, G.** (1984). "Contribution towards the study of the Madrid air mycoflora", I. *Station diversity and seasonal variation. Allergol. et Immunopathol.* 3 (12): 193-198., **Paya, M.J., Mateo, A.; Cutuli, M.T.; Suarez, G. Ferreiro, J.; Alvarez, I., Azzam, G.; Corominas, M., Torres, J.L.; Pagan, J.A.; Hernandez, L.; Fernandez, L., Garcia, D. y Pedromingo, A.** (1986). "Métodos microbiológicos de estudio. Resultados de un estudio multicéntrico de los hongos atmosféricos del litoral de la Península por medio de

cultivo en placas." *XV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Alergia e Inmunología*. Madrid. **Paya, M.J.; Pedromingo, A., Cutuli, M.T.; Mateos, A. y Suarez, G. (1988)**. "Factores de variabilidad en muestreos de la micoflora aeróbica". *Revista Ibérica de Micología*, 5:53-62.) y el agar extracto de levadura-glucosa (I.C.M.S.F. (International Commission of Microbiology and Safety of Foods) (1982). Microorganismos de los alimentos. Técnicas de análisis microbiológico, 1. Ed. Acribia. Zaragoza.; **Mossel, D.A.A. y Moreno Garcia, B. (1985)**. "Microbiología de los alimentos." *Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos*. Ed. Acribia, S.A. Zaragoza).

La temperatura y el tiempo de incubación usados son de 25-28°C y 3-7 días, en la mayoría de la bibliografía consultada (**Beerens, M. y Luquet, F.M. (1990)** *Guía práctica para el análisis de la leche y productos lácteos*. Ed. Acribia. Zaragoza.; **Kivanc, M. (1990)**. "Mould growth and presence of aflatoxin in some turkish cheeses." *J. Food Safety*, 10: 287-294.; **Berenguer Soler, J. (1982)** "Hongos". En *Técnicas para el análisis microbiológico de Alimentos y Bebidas*. Ed. Pascual. Anderson, M.R. Ministerio de Sanidad y Consumo. Instituto Nacional de Sanidad. Centro Nacional de Alimentación y Nutrición. Servicio de Microbiología).

Las placas de medio de cultivo adicionadas con 2,6 di-O-metil- β -ciclodextrina, después de 3-5 días de incubación a 28°C, se observan bajo luz UV a 365 nm, para detectar la presencia del anillo fluorescente que indicaría que podría tratarse de una cepa de *Aspergillus* productora de aflato-

xinas.

Para el análisis cuantitativo se deben usar dos placas para cada dilución, cada medio de cultivo y cada condición de incubación. Las placas deben examinarse frecuentemente durante la incubación para evitar que el crecimiento expansivo de alguna colonia oculte a otras. La enumeración de las colonias se puede hacer manualmente o con aparatos de conteo automático aunque presentan el inconveniente de no distinguir los distintos tipos de colonias o las colonias confluentes. Las placas para la enumeración deben tener entre 10 y 100 colonias. Para prevenir el alto grado de variabilidad que se puede dar en estos análisis, es conveniente que todas las condiciones de trabajo en el laboratorio estén estandarizadas (**Hartog, B.J. (un1984)**. "The detection and quantification of fungi in food." En *Introduction to food-borne fungi*. Samson, R.A., Hoekstra, E.S. y Van Oorschot, C.A.N. 2^a Ed. Centraalbureau Voor Schimmelcultures. Baarn).

2) Diagnósis de la capacidad productora de aflatoxinas de cepas de *Aspergillus*

Los inóculos de las diferentes cepas se preparan en agar Czapek (disponible comercialmente, OXOID u otras marcas) incubando a 25°C durante 7 días. Después de este tiempo, se siembra, en un punto central de los agares Sabouraud o YES adicionados con 2,6-ortodimetil β -ciclodextrina. un asa bien cargada de esporas de la cepa de que se trate. Las placas se incuban a 28°C, durante 3-5 días y se observan bajo luz UV a 365 nm, para visualizar el anillo fluorescente debido a la producción de aflatoxinas.

REIVINDICACIONES

1. Método de detección en medio de cultivo de cepas de hongos *Aspergillus* productoras de aflatoxinas mediante la adición de β -ciclodextrinas.

5

2. Método de detección, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la adición al medio de cultivo de β -ciclodextrina, preferentemente la 2,6-ortodimetil β -ciclodextrina en porcentajes del 0,3% p/v o superiores.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁷: C12Q 1/04 // (C12Q 1/04, C12R 1:66)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	CEPEDA A. et al.: "Postcolumn excitation of aflatoxins using cyclodextrins in liquid chromatography for food analysis". 1996. Journal of Chromatography A, Vol. 721, páginas 69-74.	1,2
X	VAZQUEZ et al.: Preliminary study on fluorimetric detection of aflatoxins Q1, P1 and B1 using heptakis-di-O-methyl-beta-cyclodextrin as post-column HPLC reagent". Enero 1999. Anal. Commun., Vol. 36, páginas 5-7.	1,2
X	FRANCO et al.: "Interaction between cyclodextrins and aflatoxins Q1, M1 and P1 Fluorescence and chromatographic studies". 1998. Journal of Chromatography A, Vol. 815, páginas 21-29.	1
X	VAZQUEZ et al.: "Cyclodextrins as modifiers of the luminescence characteristics of aflatoxins". 1991. Analytica Chimica Acta. Vol. 255, páginas 343-350.	1
X	US 5487998 A (UMRIGAR et al.) 30.01.1996, columna 3, línea 13 - columna 4, línea 44.	1
X	WO 9415970 A (THE UNITED STATES OF AMERICA, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 21.07.1994, página 5, línea 4 - página 6, línea 15.	1

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

19.10.2001

Examinador

A. Collados Martín Posadillo

Página

1/1