



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 369 816**

② Número de solicitud: 201030674

⑤ Int. Cl.:  
**G01N 33/487** (2006.01)  
**G01N 33/50** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **05.05.2010**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **07.12.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**07.12.2011**

⑦ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**  
**c/ Serrano, 117**  
**28006 Madrid, ES**

⑦ Inventor/es: **Campos Vaquero, Carlos;**  
**Guzmán Martínez, Rodrigo;**  
**López Fernández, María Encarnación y**  
**Casado Moragón, Ángela**

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Método para valorar la concentración y la capacidad antioxidante del ácido úrico.**

⑤ Resumen:

Método para valorar la concentración y la capacidad antioxidante del ácido úrico.

La presente invención se refiere a un método para valorar la concentración y la capacidad antioxidante del ácido úrico en muestras ya sean biológicas, en muestras procedentes de la industria alimentaria, en cosméticos ... Además mediante la presente invención se permite determinar la capacidad antioxidante sin la contribución del ácido úrico y la capacidad antioxidante total de una muestra.

ES 2 369 816 A1

**DESCRIPCIÓN**

Método para valorar la concentración y la capacidad antioxidante del ácido úrico.

5 La presente invención se refiere a un método para valorar la concentración y la capacidad antioxidante del ácido úrico en muestras ya sean biológicas, en muestras procedentes de la industria alimentaria, en cosméticos... Además mediante la presente invención se permite determinar la capacidad antioxidante sin la contribución del ácido úrico y la capacidad antioxidante total de una muestra.

**10 Estado de la técnica anterior**

El conocimiento de los efectos nocivos de los radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) ha propiciado un interés creciente en la valoración del estatus antioxidante de los individuos en estudios experimentales, epidemiológicos y clínicos así como de la capacidad antioxidante de determinadas sustancias, bebidas y alimentos. Por ello, se han desarrollado multitud de metodologías para la determinación de la capacidad antioxidante total (TAC), tales como el FRAP (Capacidad del Plasma de Reducir el ión Férrico), el TEAC (Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox), el ensayo de quimioluminiscencia o el CUPRAC (Ensayo de Reducción del Cobre(II) ó Capacidad Antioxidante de Reducción del ión Cúprico) entre otros [Karadag A, Ozcelik B, Saner S. *Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. Food Anal Methods* 2009; 2:41-60].

Debido a la dificultad de medir todos los antioxidantes de una muestra por separado, esta determinación es muy útil por ser los resultados obtenidos más representativos de la capacidad antioxidante total que la determinación de todos los antioxidantes de la muestra de forma individual, ya que considera las posibles interacciones entre los distintos antioxidantes presentes. Además, la determinación de la capacidad antioxidante total es mucho más sencilla que la determinación de todos los antioxidantes de la muestra por separado.

Sin embargo, el principal antioxidante presente en muestras biológicas, el ácido úrico (AU), está en una concentración muy superior a la del resto de antioxidantes y presenta una contribución relativa muy elevada de la capacidad antioxidante total. De hecho, la capacidad antioxidante total correlaciona altamente con los niveles de ácido úrico presentes en las muestras biológicas (plasma, orina, etc.). Ya que los niveles de ácido úrico están alterados en multitud de patologías, también después de realizar ejercicio físico o incluso por un estrés oxidativo elevado, los resultados de capacidad antioxidante total obtenidos con los métodos actuales pueden llevar a resultados inesperados y a errores de interpretación. Por ello, la determinación de la capacidad antioxidante sin la contribución relativa del ácido úrico es una determinación mucho más relevante para el estudio del estatus antioxidante y el estrés oxidativo en estudios experimentales, epidemiológicos o clínicos que la proporcionada por los métodos actuales de determinación de capacidad antioxidante total.

Existen algunos trabajos publicados en los que se hace referencia a la determinación de capacidad antioxidante sin la contribución relativa del ácido úrico. El más reciente es una publicación de nuestro grupo de investigación [Campos C, Guzmán R, López-Fernández E, Casado A. *Urinary uric acid and antioxidant capacity in children and adults with Down syndrome. Clin Biochem* 2010; 43:228-233], en la que se determina la capacidad antioxidante sin la contribución relativa de ácido úrico, pero ésta se realiza mediante una determinación indirecta en la que, además, se consideran las posibles interacciones que pudiera tener el ácido úrico puesto que éste no se eliminaba de la muestra. Anteriormente hay una publicación [Chen J, Lindmark-Månsson H, Gorton L, Åkesson B. *Antioxidant capacity of bovine milk as assayed by spectrophotometric and amperometric methods. International Dairy Journal* 2003; 13:927-935], donde se emplea uricasa para degradar el ácido úrico y luego determinan la capacidad antioxidante sin la contribución del ácido úrico utilizando el ensayo TEAC. Posteriormente, existen dos publicaciones [Nälsen C, Öhrvall M, Kamal-Eldin A, Vessby B. *Plasma antioxidant capacity among middle-aged men: The contribution of uric acid. Scand J Clin Lab Invest* 2006; 66:239-248; Nälsen C, Vessby B, Berglund L, et al. *Dietary (n-3) fatty acids reduce plasma F<sub>2</sub>-Isoprostanes but not prostaglandin F<sub>2α</sub> in healthy humans. J Nutr* 2006; 136:1222-1228] del mismo grupo de investigación en las que también se utiliza uricasa para degradar el ácido úrico de la muestra y posteriormente se determina la capacidad antioxidante sin la contribución del ácido úrico mediante quimioluminiscencia.

Teniendo en cuenta que la degradación de ácido úrico con uricasa produce peróxido de hidrógeno, el cual puede interferir en la medida posterior de capacidad antioxidante dado que puede actuar como oxidante o como antioxidante, la presente invención incluye la novedad de tratar la muestra con catalasa para eliminar la interferencia del peróxido de hidrógeno. Por otra parte, en ninguna de las metodologías citadas anteriormente se utiliza un tampón adecuado para la degradación del ácido úrico por la uricasa, y no aseguran la completa degradación de éste.

Por lo tanto se plantea la necesidad de desarrollar nuevos métodos que subsanen las deficiencias anteriormente mostradas y que permitan determinar la capacidad antioxidante de muestras biológicas, sin la contribución del ácido úrico o del peróxido de hidrógeno.

**65 Descripción de la invención**

La presente invención se refiere a un nuevo método para la determinación de la concentración y de la contribución antioxidante del ácido úrico en muestras, ya sean biológicas, en muestras procedentes de la industria alimentaria, en cosméticos... que muestra la novedad de tratar la muestra con las enzimas uricasa y catalasa para eliminar la

## ES 2 369 816 A1

contribución del ácido úrico y del peróxido de hidrógeno, presentes en las muestras biológicas. Además se emplea un pH óptimo tanto para la uricasa como para la catalasa. Así mismo, este pH es también adecuado para la reacción que tiene lugar en la determinación posterior de capacidad antioxidante. Además, la presente invención permite valorar no solo la capacidad antioxidante del ácido úrico si no también, y de forma simultánea, la capacidad antioxidante sin la contribución del ácido úrico, la capacidad antioxidante total y la concentración del propio ácido úrico.

Por lo tanto un primer aspecto esencial de la presente invención, se refiere a un método para valorar la capacidad antioxidante del ácido úrico de una muestra (Figura 1), que comprende las siguientes etapas:

- a) obtención de una muestra. En el caso de tratarse de una muestra biológica esta está aislada del individuo.
- b) añadir a una alícuota (I) de la muestra una solución de la enzima catalasa y una disolución de la enzima uricasa;
- c) añadir a una alícuota (II) de la muestra una solución de la enzima catalasa y una disolución tampón; y
- d) determinar la capacidad antioxidante sin la contribución del ácido úrico de la alícuota (I) y la capacidad antioxidante total de la alícuota (II).

Según una realización preferida, las muestras son mezcladas con BCS (2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolin-disulfónico) en disolución tampón TRIS y se agita en Vortex. La cantidad a mezclar de BCS es de 200 a 400  $\mu\text{L}$ , preferiblemente de 300  $\mu\text{L}$  y a una concentración de 0,5 a 3 mM, preferiblemente de 1,5 a 2,5 mM, más preferiblemente de 2 mM.

Según otra realización preferida, el tampón TRIS es de 0,05 M a 1 M, preferiblemente de 0,1 a 0,5 M, más preferiblemente de 0,1 M a un pH de 8,4 a 9,0, más preferiblemente de 8,5.

Según otra realización preferida, la muestra se selecciona del grupo formado por orina, líquido cefalorraquídeo, plasma, suero, sudor, saliva, muestra cosmética, bebidas, alimentos, entre otras y cada alícuota tiene un volumen de partida de 50 a 100  $\mu\text{L}$ , preferiblemente de 60 a 85  $\mu\text{L}$  y más preferiblemente de 75  $\mu\text{L}$ .

Según otra realización preferida, se adicionan a la alícuota (I) y (II) de 50 a 100  $\mu\text{L}$  de la enzima catalasa, preferiblemente 75  $\mu\text{L}$ , preparada con agua destilada y a una concentración de 50 a 1000 U/mL, preferiblemente de 100 U/mL.

Según otra realización preferida, se adicionan a la alícuota (I) de 100 a 200  $\mu\text{L}$ , preferiblemente 150  $\mu\text{L}$ , de la enzima uricasa preparada con tampón TRIS 0,1 M pH 8,5 a una concentración de 0,8 a 4 U/mL, preferiblemente de 1 U/mL.

Según otra realización preferida, se adicionan a la alícuota (II) de 100 a 200  $\mu\text{L}$ , preferiblemente 150  $\mu\text{L}$ , de una disolución tampón TRIS 0,1 M pH 8,5.

Según otra realización preferida, la alícuota (I) se incuba de 25 a 35 minutos, preferiblemente 30 minutos, a temperatura ambiente tras añadir las enzimas catalasa y uricasa.

Según otra realización preferida, la alícuota (II) se incuba de 0 a 35 minutos, preferiblemente 30 minutos, a temperatura ambiente tras añadir la enzima catalasa y la disolución tampón.

Según otra realización preferida la etapa de determinar la capacidad antioxidante sin la contribución del ácido úrico de la alícuota (I), comprende las siguientes sub-etapas:

- i) realizar una primera lectura espectrofotométrica;
- ii) adicionar sulfato de cobre;
- iii) parar la reacción;
- iv) realizar una segunda lectura espectrofotométrica;
- v) restar los valores de la segunda lectura espectrofotométrica a los de la primera lectura; y
- vii) medir la cantidad de complejo formado por Cu (I) y BCS. Para ello, se calculan los valores de la muestra en base a los valores obtenidos para una curva estándar (extrapolando) y expresar el resultado como equivalentes de antioxidante (Trolox) en mM.

## ES 2 369 816 A1

Según otra realización preferida, las lecturas espectrofotométricas se hacen en un rango de longitudes de onda de 480 a 495 nm, preferiblemente a 490 nm.

5 Según otra realización preferida, se adicionan de 10 a 100  $\mu\text{L}$  de una solución de sulfato de cobre, preferiblemente de 30 a 60  $\mu\text{L}$ , más preferiblemente de 50  $\mu\text{L}$  y se deja incubar de 1 a 5 minutos, preferiblemente 3 minutos, a temperatura ambiente. La concentración de sulfato de cobre a añadir es de 2 a 8 mM, preferiblemente de 3 a 6 mM, más preferiblemente de 4 mM.

10 Según otra realización preferida, la reacción se para con un agente quelante, preferiblemente EDTA en una cantidad de 10 a 80  $\mu\text{L}$ , preferiblemente de 40 a 60  $\mu\text{L}$ , más preferiblemente a 50  $\mu\text{L}$ , a una concentración de 0,01 a 0,5 mM, preferiblemente de 0,01 a 0,1 mM, más preferiblemente de 0,01 mM.

15 Según otra realización preferida, la etapa de determinar la capacidad antioxidante total de la alícuota (II), comprende las siguientes sub-etapas:

- 15 i) realizar una primera lectura espectrofotométrica;
- ii) adicionar sulfato de cobre;
- 20 iii) parar la reacción;
- iv) realizar una segunda lectura espectrofotométrica;
- v) restar los valores de la segunda lectura espectrofotométrica a los de la primera lectura; y
- 25 vi) medir la cantidad de complejo formado por Cu (I) y BCS. Para ello, se calculan los valores de la muestra en base a los valores obtenidos para una curva estándar (extrapolando) y expresar el resultado como equivalentes de antioxidante (Trolox) en mM.

30 Según otra realización preferida, las lecturas espectrofotométricas se hacen en un rango de longitudes de onda de 480 a 495 nm, preferiblemente a 490 nm.

35 Según otra realización preferida, se adicionan de 10 a 100  $\mu\text{L}$  de una solución de sulfato de cobre, preferiblemente de 30 a 60  $\mu\text{L}$ , más preferiblemente de 50  $\mu\text{L}$  y se deja incubar de 1 a 5 minutos, preferiblemente 3 minutos, a temperatura ambiente. La concentración de sulfato de cobre a añadir es de 2 a 8 mM, preferiblemente de 3 a 6 mM, más preferiblemente de 4 mM.

40 Según otra realización preferida, la reacción se para con un agente quelante, preferiblemente EDTA en una cantidad de 10 a 80  $\mu\text{L}$ , preferiblemente de 40 a 60  $\mu\text{L}$ , más preferiblemente a 50  $\mu\text{L}$ , a una concentración de 0,01 a 0,5 mM, preferiblemente de 0,01 a 0,1 mM, más preferiblemente de 0,01 mM.

45 Según otra realización preferida, la contribución antioxidante del ácido úrico de una muestra se determina mediante la diferencia entre la capacidad antioxidante total y la capacidad antioxidante sin la contribución de ácido úrico.

Según otra realización preferida, la concentración del ácido úrico de una muestra se determina extrapolando el resultado de la diferencia entre la capacidad antioxidante total y la capacidad antioxidante sin la contribución del ácido úrico en una curva de calibrado obtenida con ácido úrico.

50 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

### 55 Descripción de las figuras

La figura 1 representa el esquema del mecanismo de acción de la uricasa y la catalasa y posterior reducción del Cu(II) a Cu(I) por los antioxidantes presentes en la muestra.

60 La figura 2 representa la curva de calibrado obtenida para 6 concentraciones de Trolox (1 mM, 0,5 mM, 0,25 mM, 0,125 mM, 0,0625 mM y 0,03125 mM) en el procedimiento de valoración de la capacidad antioxidante sin la contribución del ácido úrico. Los resultados corresponden a los obtenidos en el ejemplo de realización.

65 La figura 3 representa las curvas de calibrado obtenidas para los antioxidantes: Trolox (●), ácido gálico (○), glutatión (GSH) (▼), N-acetilcisteína (NAC) (Δ), ácido ascórbico (■), tirón (□), bilirrubina (◆), 3-terc-butil 4-hidroxianisol (BHA) (◇) y albúmina (▲), siguiendo el procedimiento de valoración de la capacidad antioxidante sin la contribución del ácido úrico.

## ES 2 369 816 A1

La figura 4 representa la curva de calibrado obtenida para 6 concentraciones de ácido úrico (1 mM, 0,5 mM, 0,25 mM, 0,125 mM, 0,0625 mM y 0,03125 mM) siguiendo el procedimiento de valoración del ácido úrico. Los resultados corresponden a los obtenidos en el ejemplo de realización.

5

### Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad del método de diagnóstico/pronóstico del CCR basado en la detección en suero de anticuerpos frente a los autoantígenos tumorales descritos.

#### Ejemplo 1

15 *Ejemplo de realización de la invención para una muestra de plasma sanguíneo en lector de microplaca*

##### *Reactivos y aparatos*

20 Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromal-2-carboxílico), uricasa de *Candida* sp. (EC 1.7.3.3), catalasa de hígado bovino (EC 1.11.1.6), tampón fosfato salino (PBS) y Tris(hidroximetil)aminometano fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Ácido úrico, sulfato de cobre anhidro, sal disódica del ácido 2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolindisulfónico (BCS) fueron de Fluka (Buchs, Suiza). Ácido etilendiamintetracético sal disódica (EDTA), hidróxido sódico y ácido clorhídrico fueron obtenidos de Probus (Barcelona, España). Agua bidestilada fue obtenida mediante un sistema Milli-RO (Millipore, Bedford, MA, EEUU).

25

Se emplea un pH-metro Crison GLP21 (Alella, España) para las mediciones de pH. Un Vortex REAX 2000 (Heidolph, Alemania) para agitar los reactivos. Una balanza electrónica (AND modelo ER-182). Las medidas espectrofotométricas se realizan en un lector de placas con filtro de 490 nm (Bio-Tek ELx808, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, EEUU). El lector de placas fue controlado mediante el software KCjuniors. Se emplean pocillos F16 MaxiSorp (Nunc, Roskilde, Dinamarca de 350  $\mu$ L/pocillo).

30

##### *Obtención de la muestra*

35 Se empleó sangre entera humana obtenida por venopunción en tubo previamente heparinizado. El plasma se obtuvo tras centrifugación de sangre entera y separando el sobrenadante que o bien se valora inmediatamente o se almacena en alícuotas a -80°C durante un mes hasta el ensayo.

##### *Procedimiento*

Se realizan a continuación los siguientes pasos:

40 1. Se añadieron 75  $\mu$ L de muestra a dos tubos (marcados como 1 y 2), cada uno con 300  $\mu$ L de 2 mM de sal disódica del ácido 2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolindisulfónico en disolución tampón (0,1 M TRIS a pH 8,5) y se agitó en Vortex. El blanco y la solución estándar se prepararon de la misma forma usando 75  $\mu$ L de agua bidestilada, 75  $\mu$ L de una solución estándar (de Trolox y de ácido úrico) de concentración conocida, respectivamente.

50 Como estándares se utilizaron 6 concentraciones distintas de Trolox (análogo soluble en agua de la vitamina E) y de ácido úrico (1 mM, 0,5 mM, 0,25 mM, 0,125 mM, 0,0625 mM y 0,03125 mM). Los estándares de Trolox se prepararon a partir de un stock 2 mM de Trolox disuelto en PBS 1X. Los estándares de ácido úrico se prepararon a partir de un stock 2 mM de ácido úrico disuelto con 1 M de hidróxido sódico en agua destilada. Ambos stocks se almacenaron a -20°C hasta el análisis;

55 2. Se añadieron 75  $\mu$ L de solución de catalasa (100 U/mL) preparada con agua destilada a cada tubo;

60 3. Se añadieron 150  $\mu$ L de solución de uricasa (1 U/mL) preparada con tampón TRIS 0,1 M pH 8,5 al tubo 1 y 150  $\mu$ L de disolución tampón (0,1 M TRIS a pH 8,5) al tubo 2, se agitó en Vortex e se incubó 30 minutos a temperatura ambiente;

4. Tras la incubación, se pusieron 200  $\mu$ L de cada mezcla anterior en un pocillo de una microplaca;

65 5. Se realizó una primera lectura espectrofotométrica de las muestras a 490 nm, obteniéndose los siguientes valores para el tubo 1: 0,044 (para el blanco), 0,108 (para la muestra), 0,047 (para el estándar 1 mM de Trolox), 0,047 (para el estándar 0,5 mM de Trolox), 0,050 (para el estándar 0,25 mM de Trolox), 0,053 (para el estándar 0,125 mM de Trolox), 0,047 (para el estándar 0,0625 mM de Trolox) y 0,049 (para el estándar 0,03125 mM de Trolox), 0,044 (para el estándar 1 mM de ácido úrico), 0,048 (para el estándar 0,5 mM de ácido úrico), 0,045 (para el estándar 0,25 mM de ácido úrico), 0,047 (para el estándar 0,125 mM de ácido úrico), 0,047 (para el estándar 0,0625 mM de ácido úrico)

## ES 2 369 816 A1

y 0,047 (para el estándar 0,03125 mM de ácido úrico) y los siguientes valores para el tubo 2: 0,040 (para el blanco), 0,107 (para la muestra), 0,043 (para el estándar 1 mM de Trolox), 0,043 (para el estándar 0,5 mM de Trolox), 0,046 (para el estándar 0,25 mM de Trolox), 0,049 (para el estándar 0,125 mM de Trolox), 0,043 (para el estándar 0,0625 mM de Trolox) y 0,045 (para el estándar 0,03125 mM de Trolox), 0,042 (para el estándar 1 mM de ácido úrico), 0,041 (para el estándar 0,5 mM de ácido úrico), 0,042 (para el estándar 0,25 mM de ácido úrico), 0,040 (para el estándar 0,125 mM de ácido úrico), 0,041 (para el estándar 0,0625 mM de ácido úrico) y 0,050 (para el estándar 0,03125 mM de ácido úrico);

6. Se añadieron 50  $\mu$ L de solución de 4 mM de sulfato de cobre a cada pocillo y se incubó 3 minutos a temperatura ambiente;

7. Se añadieron 50  $\mu$ L de 0,01 M de EDTA a cada pocillo para parar la reacción;

8. Se realizó una segunda lectura espectrofotométrica de las muestras a 490 nm, obteniéndose los siguientes valores para el tubo 1: 0,059 (para el blanco), 0,402 (para la muestra), 1,701 (para el estándar 1 mM de Trolox), 0,882 (para el estándar 0,5 mM de Trolox), 0,491 (para el estándar 0,25 mM de Trolox), 0,264 (para el estándar 0,125 mM de Trolox), 0,159 (para el estándar 0,0625 mM de Trolox) y 0,107 (para el estándar 0,03125 mM de Trolox), 0,063 (para el estándar 1 mM de ácido úrico), 0,067 (para el estándar 0,5 mM de ácido úrico), 0,059 (para el estándar 0,25 mM de ácido úrico), 0,060 (para el estándar 0,125 mM de ácido úrico), 0,061 (para el estándar 0,0625 mM de ácido úrico) y 0,059 (para el estándar 0,03125 mM de ácido úrico) y los siguientes valores para el tubo 2: 0,053 (para el blanco), 0,871 (para la muestra), 1,696 (para el estándar 1 mM de Trolox), 0,876 (para el estándar 0,5 mM de Trolox), 0,486 (para el estándar 0,25 mM de Trolox), 0,258 (para el estándar 0,125 mM de Trolox), 0,153 (para el estándar 0,0625 mM de Trolox) y 0,101 (para el estándar 0,03125 mM de Trolox), 1,652 (para el estándar 1 mM de ácido úrico), 0,856 (para el estándar 0,5 mM de ácido úrico), 0,456 (para el estándar 0,25 mM de ácido úrico), 0,241 (para el estándar 0,125 mM de ácido úrico), 0,155 (para el estándar 0,0625 mM de ácido úrico) y 0,112 (para el estándar 0,03125 mM de ácido úrico);

### *Valoración la capacidad antioxidante sin la contribución del ácido úrico*

9. Se restaron los valores de absorbancia de la primera lectura espectrofotométrica a los de la segunda lectura espectrofotométrica, ambas obtenidas para las muestras tratadas con uricasa (tubo 1), obteniéndose los siguientes valores para el tubo 1: 0,015 (para el blanco), 0,294 (para la muestra), 1,655 (para el estándar 1 mM de Trolox), 0,835 (para el estándar 0,5 mM de Trolox), 0,442 (para el estándar 0,25 mM de Trolox), 0,211 (para el estándar 0,125 mM de Trolox), 0,112 (para el estándar 0,0625 mM de Trolox) y 0,058 (para el estándar 0,03125 mM de Trolox), 0,019 (para el estándar 1 mM de ácido úrico), 0,019 (para el estándar 0,5 mM de ácido úrico), 0,014 (para el estándar 0,25 mM de ácido úrico), 0,013 (para el estándar 0,125 mM de ácido úrico), 0,014 (para el estándar 0,0625 mM de ácido úrico) y 0,012 (para el estándar 0,03125 mM de ácido úrico);

10. Se restó el valor obtenido para el blanco en la resta anterior a los valores obtenidos para las muestras y los estándares en la misma resta anterior, obteniéndose los siguientes valores: 0,000 (para el blanco), 0,279 (para la muestra), 1,640 (para el estándar 1 mM de Trolox), 0,820 (para el estándar 0,5 mM de Trolox), 0,427 (para el estándar 0,25 mM de Trolox), 0,196 (para el estándar 0,125 mM de Trolox), 0,097 (para el estándar 0,0625 mM de Trolox) y 0,043 (para el estándar 0,03125 mM de Trolox), 0,004 (para el estándar 1 mM de ácido úrico), 0,004 (para el estándar 0,5 mM de ácido úrico), -0,001 (para el estándar 0,25 mM de ácido úrico), -0,002 (para el estándar 0,125 mM de ácido úrico), -0,001 (para el estándar 0,0625 mM de ácido úrico) y -0,003 (para el estándar 0,03125 mM de ácido úrico).

11. Se obtuvo la curva estándar de Trolox a partir de los valores obtenidos en el punto 10 para las muestras estándar tratadas con uricasa (tubo 1), (Figura 2);

12. Se calculó el valor de la muestra extrapolando el valor obtenido en la curva estándar obtenida anteriormente (Figura 2), obteniéndose un resultado de 0,171 mM equivalentes de Trolox;

### *Valoración la capacidad antioxidante total*

13. Se restaron los valores de absorbancia de la primera lectura espectrofotométrica a los de la segunda lectura espectrofotométrica, ambas obtenidas para las muestras sin tratar con uricasa (tubo 2), obteniéndose los siguientes valores: 0,013 (para el blanco), 0,764 (para la muestra), 1,653 (para el estándar 1 mM de Trolox), 0,833 (para el estándar 0,5 mM de Trolox), 0,440 (para el estándar 0,25 mM de Trolox), 0,209 (para el estándar 0,125 mM de Trolox), 0,110 (para el estándar 0,0625 mM de Trolox) y 0,056 (para el estándar 0,03125 mM de Trolox), 1,610 (para el estándar 1 mM de ácido úrico), 0,816 (para el estándar 0,5 mM de ácido úrico), 0,414 (para el estándar 0,25 mM de ácido úrico), 0,201 (para el estándar 0,125 mM de ácido úrico), 0,114 (para el estándar 0,0625 mM de ácido úrico) y 0,062 (para el estándar 0,03125 mM de ácido úrico);

14. Se restó el valor obtenido para el blanco en la resta anterior a los valores obtenidos para las muestras y los estándares en la misma resta anterior, obteniéndose los siguientes valores: 0,000 (para el blanco), 0,751 (para la muestra), 1,640 (para el estándar 1 mM de Trolox), 0,820 (para el estándar 0,5 mM de Trolox), 0,427 (para el estándar

## ES 2 369 816 A1

0,25 mM de Trolox), 0,196 (para el estándar 0,125 mM de Trolox), 0,097 (para el estándar 0,0625 mM de Trolox) y 0,043 (para el estándar 0,03125 mM de Trolox), 1,597 (para el estándar 1 mM de ácido úrico), 0,803 (para el estándar 0,5 mM de ácido úrico), 0,401 (para el estándar 0,25 mM de ácido úrico), 0,188 (para el estándar 0,125 mM de ácido úrico), 0,101 (para el estándar 0,0625 mM de ácido úrico) y 0,049 (para el estándar 0,03125 mM de ácido úrico);

5

15. Se obtuvo la curva estándar de Trolox a partir de los valores obtenidos en el punto 14 para las muestras estándar sin tratar con uricasa (tubo 2), (Figura 2);

16. Se calculó el valor de la muestra extrapolando el valor obtenido en la curva estándar obtenida anteriormente (Figura 2), obteniéndose un resultado de 0,458 mM equivalentes de Trolox;

10

### *Valoración del ácido úrico*

17. Se restaron los valores obtenidos para la muestra y los estándares de ácido úrico en el punto 14 a los obtenidos en el punto 10, obteniéndose los siguientes valores: 0,472 (para la muestra), 1,593 (para el estándar 1 mM de ácido úrico), 0,799 (para el estándar 0,5 mM de ácido úrico), 0,402 (para el estándar 0,25 mM de ácido úrico), 0,190 (para el estándar 0,125 mM de ácido úrico), 0,102 (para el estándar 0,0625 mM de ácido úrico) y 0,052 (para el estándar 0,03125 mM de ácido úrico);

20

18. Se obtuvo la curva estándar de ácido úrico a partir de los valores obtenidos en la resta anterior (Figura 4);

19. Se calculó la concentración de ácido úrico de la muestra extrapolando los valores obtenidos en la curva estándar obtenida anteriormente, obteniéndose el siguiente resultado 0,297 mM de ácido úrico.

25

20. Se calculó la contribución antioxidante del ácido úrico de la muestra extrapolando el valor obtenido para la muestra en el punto 14 en la curva estándar obtenida en el punto 15 (Figura 2). Así, el resultado es de 0,288 mM equivalentes de Trolox.

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 369 816 A1

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para determinar la concentración y la contribución antioxidante del ácido úrico de una muestra, que comprende las siguientes etapas:
- a) obtención de una muestra a analizar;
  - 10 b) añadir a una alícuota (I) de la muestra una solución de la enzima catalasa y una disolución de la enzima uricasa;
  - c) añadir a una alícuota (II) de la muestra una solución de la enzima catalasa y una disolución tampón; y
  - 15 d) determinar la capacidad antioxidante sin la contribución del ácido úrico de la alícuota (I) y la capacidad antioxidante total de la alícuota (II).
2. El método según la reivindicación 1, donde las muestras son mezclas con BCS en disolución tampón TRIS.
- 20 3. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde la cantidad a mezclar de BCS es de 200 a 400  $\mu\text{L}$ , preferiblemente de 300  $\mu\text{L}$  y a una concentración de 0,5 a 3 mM, preferiblemente de 1,5 a 2,5 mM, más preferiblemente de 2 mM.
- 25 4. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el tampón TRIS tiene una concentración de 0,05 M a 1 M, preferiblemente de 0,1 a 0,5 M, más preferiblemente de 0,1 M a un pH de 8,4 a 9,0, más preferiblemente de 8,5.
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la muestra se selecciona del grupo formado por orina, líquido cefalorraquídeo, plasma, suero, sudor, saliva, muestra cosmética, alimentos y bebidas.
- 30 6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde las alícuotas (I) y (II) tienen un volumen de muestra de partida de 50 a 100  $\mu\text{L}$ , preferiblemente de 60 a 85  $\mu\text{L}$  y más preferiblemente de 75  $\mu\text{L}$ .
- 35 7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde se adicionan a la alícuota (I) y (II) de 50 a 100  $\mu\text{L}$  de la enzima catalasa, preferiblemente 75  $\mu\text{L}$ , preparada con agua destilada a una concentración de 50 a 1000 U/mL, preferiblemente de 100 U/mL.
- 40 8. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde se adicionan a la alícuota (I) de 100 a 200  $\mu\text{L}$ , preferiblemente 150  $\mu\text{L}$ , de la enzima uricasa preparada con tampón TRIS 0,1 M pH 8,5 a una concentración de 0,8 a 4 U/mL, preferiblemente de 1 U/mL.
- 45 9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde se adicionan a la alícuota (II) de 100 a 200  $\mu\text{L}$ , preferiblemente 150  $\mu\text{L}$ , de una disolución tampón TRIS 0,1 M pH 8,5.
- 50 10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde la etapa de determinar la capacidad antioxidante sin la contribución del ácido úrico de la alícuota (I) y la etapa de determinar la capacidad antioxidante total de la alícuota (II), comprenden ambas las siguientes sub-etapas:
- i) realizar una primera lectura espectrofotométrica;
  - 55 ii) adicionar sulfato de cobre;
  - iii) parar la reacción;
  - iv) realizar una segunda lectura espectrofotométrica;
  - v) restar los valores de la segunda lectura espectrofotométrica a los de la primera lectura; y
  - 60 vi) medir la cantidad de complejo formado por Cu (I) y BCS.
11. El método según la reivindicación 10, donde las lecturas espectrofotométricas se hacen en un rango de longitudes de onda de 480 a 495 nm, preferiblemente a 490 nm.
- 65 12. El método según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, donde se adicionan de 10 a 100  $\mu\text{L}$  de una solución de sulfato de cobre, preferiblemente de 30 a 60  $\mu\text{L}$ , más preferiblemente de 50  $\mu\text{L}$ , de concentración de 2 a 8 mM, preferiblemente de 3 a 6 mM, más preferiblemente de 4 mM.



## ES 2 369 816 A1

13. El método según la reivindicación 12, donde el sulfato de cobre se deja incubar de 1 a 5 minutos, preferiblemente 3 minutos, a temperatura ambiente.

5 14. El método según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, donde la reacción se para con un agente quelante, preferiblemente EDTA en una cantidad de 10 a 80  $\mu\text{L}$ , preferiblemente de 40 a 60  $\mu\text{L}$ , más preferiblemente a 50  $\mu\text{L}$ , a una concentración de 0,01 a 0,5 mM, preferiblemente de 0,01 a 0,1 mM, más preferiblemente de 0,01 mM.

10 15. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde la contribución antioxidante del ácido úrico de una muestra se determina mediante la diferencia entre la capacidad antioxidante total y la capacidad antioxidante sin la contribución del ácido úrico.

15 16. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde la concentración del ácido úrico de una muestra se determina extrapolando el resultado de la diferencia entre la capacidad antioxidante total y la capacidad antioxidante sin la contribución del ácido úrico en una curva de calibrado obtenida con ácido úrico.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

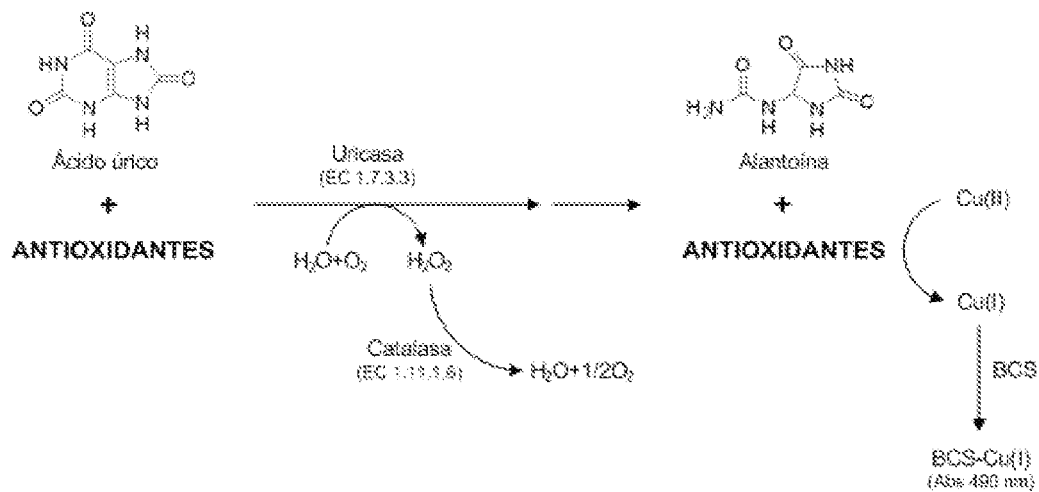


FIG. 1

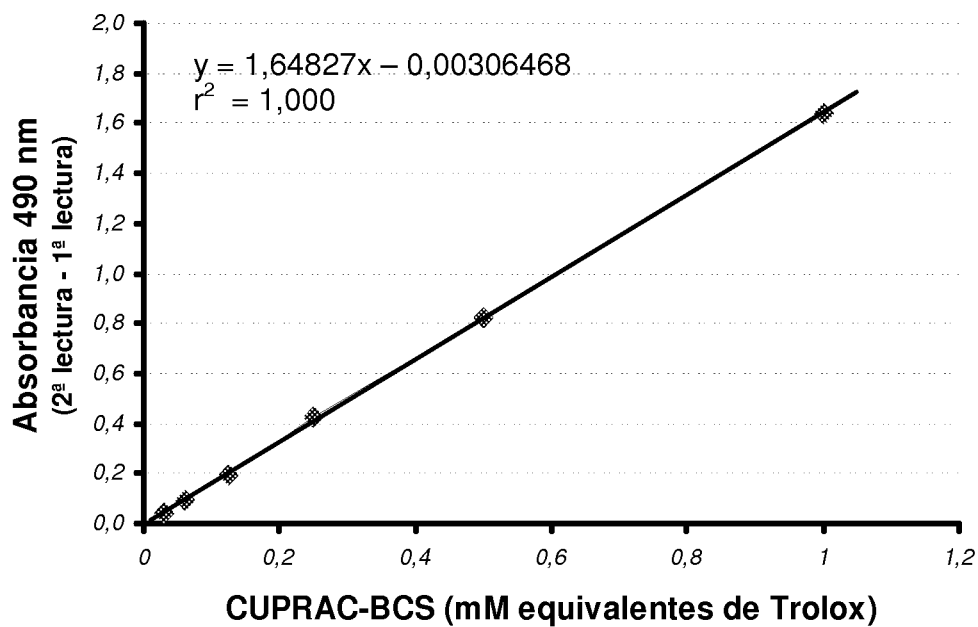


FIG. 2

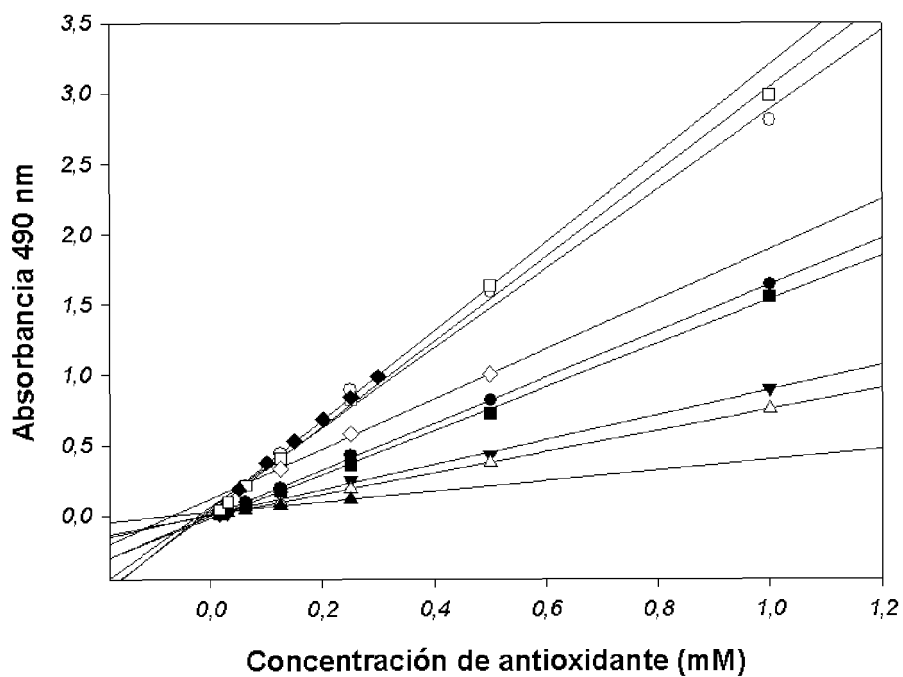


FIG. 3

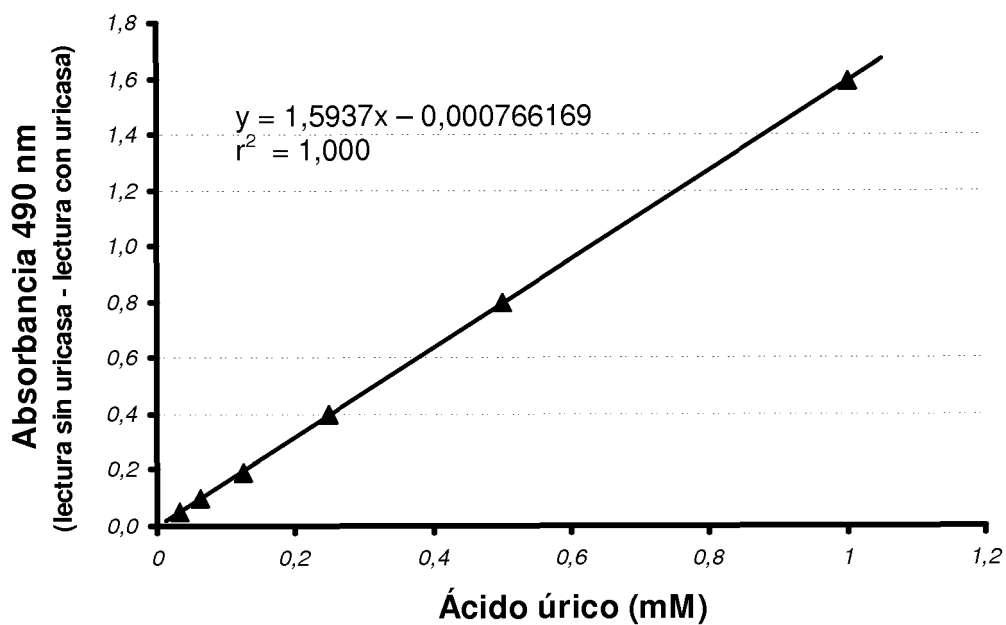


FIG. 4



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201030674

②② Fecha de presentación de la solicitud: 05.05.2010

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/487** (2006.01)  
**G01N33/50** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 6613577 B1 (DA CRUZ) 02.09.2003, todo el documento.	1,10
A	WO 2007113600 A1 (KOLIAKOS, GEORGE; HAMIDI ALAMDARI; DARYOUSH) 11.10.2007, todo el documento.	1,10
A	CARLOS CAMPOS et al.: "Urinary uric acid and antioxidant capacity in children and adults with Down syndrome." Clinical Biochemistry 43 (2010) 228-233. Todo el documento.	1,10
A	APAK, R. et al.: "Total antioxidant capacity assay human serum using copper(ii)-neocuproine as chromogenic oxidant: the CUPRAC method." Free. Radic. Res. Sep. 39(9) 2005 949-61. Todo el documento.	1,10

#### 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 nº:

Fecha de realización del informe  
04.11.2011

Examinador  
A. Amaro Roldan

Página  
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 04.11.2011

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-16	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-16	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 6613577 B1 (DA CRUZ)	02.09.2003
D02	WO 2007113600 A1 (KOLIAKOS, GEORGE; HAMIDI ALAMDARI; DARYOUSH)	11.10.2007
D03	CARLOS CAMPOS et al.: "Urinary uric acid and antioxidant capacity in children and adults with Down syndrome." Clinical Biochemistry 43 (2010) 228-233. Todo el documento.	26.09.2009
D04	A APAK, R. et al.: "Total antioxidant capacity assay human serum using copper(ii)-neocuproine as chromogenic oxidant: the CUPRAC method." Free. Radic. Res. Sep. 39(9) 2005 949-61. Todo el documento.	9.2005

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud se refiere a un método para determinar la concentración de ácido úrico y su capacidad antioxidante en muestras biológicas, procedentes de la industria alimentaria, de cosméticos y similares. Para ello, se determina la cantidad de ácido úrico cogiendo una alícuota de la muestra y añadiendo una alícuota de catalasa y una disolución de uricasa, y añadiendo a otra muestra similar solamente la catalasa en una disolución tampón, y midiendo la capacidad antioxidante de ambas muestras, siendo la diferencia debida al ácido úrico (reivindicaciones 1-9). La determinación de la capacidad antioxidante de ambas alícuotas comprenden las siguientes sub-etapas: a) realizar una primera lectura espectrofotométrica; b) añadir sulfato de cobre; c) parar la reacción; d) realizar una segunda lectura espectrofotométrica y restar los valores obtenidos a los de la primera lectura; y e) medir la cantidad de complejo formado por cobre (I) y BC (2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolindisulfónico o bathocuproina). Para ello, se calculan los valores de la muestra en base a los valores obtenidos por una curva estándar (extrapolando) y se expresa el resultado como equivalentes de antioxidante (Trolox) en mM (reivindicaciones 10-16).

**D01** se refiere a la utilización de la bathocuproina (BC) para la evaluación del poder antioxidante en líquidos y soluciones en soluciones de sulfato de cobre, denominadi CUPRA-BC . La BC forma complejos estables específicamente con Cu(I) pero no con Cu(II). Así, se reivindica un método para determinar el poder antioxidante de un líquido orgánico o inorgánico utilizando BC, que comprende: a) mezclar una muestra de dicho líquido con BC; b) añadir a la mezcla una solución de sulfato de cobre; y c) determinar la cantidad de iones Cu(I) formados por reducción de Cu(II) por todas las sustancias antioxidantes presentes, midiendo la cantidad de complejo formado por el Cu(I) y la BC, y así estableciendo la correlación de la cantidad de iones Cu(I) con el poder oxidante del líquido. Además se lleva a cabo un análisis espectrofotométrico de las muestras a 490 nm antes y después del tratamiento con BC (reivindicaciones 1-5).

**D02** describe un método químico para determinar el resultado oxidante-antioxidante en muestras biológicas (suero, plasma, orina, etc). Se llevan a cabo dos reacciones al mismo tiempo, una de oxidación-reducción y la otra enzimática. Las soluciones estándar se pueden obtener mezclando distintas cantidades (0-100%) de peróxido de hidrógeno (como representante de los oxidantes) y ácido úrico (como representante de los anti-oxidantes). Tiene especial utilidad para el diagnóstico de enfermedades relacionadas con la edad y metabólicas como la diabetes. Además la invención puede ser útil para estimar el éxito de una terapia antioxidante (resumen).

**D03**, de los mismos autores de la presente invención, se refiere a un método para la determinación del ácido úrico y su capacidad antioxidante, en niños y adultos con el síndrome de Down. Para la medida del ácido úrico se utiliza la reacción de la uricasa, y el método CUPRA-BC (ver D01) y las medidas espectrofotométricas se realizan a 490 nm.

**D04** también utiliza el método CUPRAC para la determinación del ácido úrico pero después de incubar las muestras a 50°C durante 20 minutos y la absorbancia se lee a 450 nm.

**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA**

Los documentos citados solo muestran el estado general de la técnica y no se consideran de particular relevancia, ya que para una persona experta en la materia, no sería obvio aplicar las características de los documentos citados y llegar a la invención tal y como se menciona en las reivindicaciones 1-16. Por lo tanto, el objeto de la presente solicitud cumple los requisitos de novedad y de actividad inventiva de acuerdo con los Artículos 6-8 de la Ley de Patentes 11/1986.