

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 590 351**

21 Número de solicitud: 201530688

51 Int. Cl.:

G01N 33/52 (2006.01)

C09B 43/06 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

18.05.2015

43 Fecha de publicación de la solicitud:

21.11.2016

Fecha de concesión:

04.09.2017

45 Fecha de publicación de la concesión:

11.09.2017

73 Titular/es:

**ELECTROCHEMISTRY FOR LIGHTWEIGHT &
INTEGRATED ANALYTICAL SOLUTIONS ELIAS
SL (85.0%)**
Campus Universitario Ctra Utrera Km 1 Edif. 47 B02
41013 Sevilla (Sevilla) ES y
**UNIVERSIDAD PABLO DE OLAVIDE DE SEVILLA
(15.0%)**

72 Inventor/es:

EL KAOUTIT ZERRY , Mohammed;
JIMENEZ RODRIGUEZ, Antonia Mercedes y
LOBO HERNANDEZ, Alvaro

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE SÍNTESIS Y ALMACENAMIENTO DE DISOLUCIÓN DEL RADICAL
ABTS Y SU USO PARA LA MEDIDA DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE**

57 Resumen:

Es un procedimiento de síntesis y almacenamiento de una disolución estable del radical libre ABTS^{•+}. Estable porque la disolución no contiene restos de catalizadores y de oxidantes y además esta almacenada bajo gas inerte y fuera de la luz. Esta disolución se usa como base de un KIT muy sencillo para medir la capacidad antioxidante de muestras de interés. El KIT resultante se compone solo de esa disolución y de un patrón cualquiera y proporciona la medida TEAC en un tiempo menos de cuatro minutos usando un espectrofotómetro como aparato de medida. Este KIT es también válido para la medida del contenido polifenólico total o de cualquier otro antioxidante presente de manera individual en una muestra.

ES 2 590 351 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

DESCRIPCIÓN

**PROCEDIMIENTO DE SÍNTESIS Y ALMACENAMIENTO DE DISOLUCIÓN DEL
RADICAL ABTS Y SU USO PARA LA MEDIDA DE LA CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE**

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

10 La presente invención pertenece al sector de análisis bioquímico en particular paramédico, cosmético, agroalimentario y/o nutricional.

La presente invención se refiere a un procedimiento de síntesis y almacenamiento de una disolución estable del radical orgánico libre del "ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)" [ABTS⁺⁺] y su aplicación directa como cromóforo en la

15 determinación de la capacidad antioxidante total de muestras de interés.

La ventaja clave de esta invención es que dicho radical es estable por un largo tiempo; más de tres meses.

A diferencia de los KIT comerciales, donde el operario sintetiza el radical libre justo antes de proceder a la medida y a partir de varias disoluciones, con esta invención el

20 radical libre ABTS⁺⁺ se puede suministrar en una disolución única lista para su uso como cromóforo.

El uso de esa disolución se describe como base de un KIT muy simple y hará posible la determinación de la capacidad antioxidante de muestras agroalimentarias (frutas, bebidas y extractos vegetales) y biomédicas (extractos celulares, plasma, suero

25 sanguíneo,...), y/o de formulaciones farmacéuticas parafarmacéuticas y cosméticas, de una manera más rápida y precisa

Con esta invención la determinación de la capacidad antioxidante se puede hacer en solo dos pasos y en un tiempo inferior a cuatro minutos.

30 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

El desarrollo de métodos e instrumentos para la determinación *in-Vitro* de la capacidad antioxidante (AOC) de muestras de origen natural, fisiológico o industrial ha sido objeto de un considerable interés científico-técnico en las últimas tres décadas (WO 2013/12.

35 80. 15. A1; WO 91/19. 979; EP. 08. 69. 361. A2; WO 2005/ 02. 2116; US 006. 06. 03. 24 A; US 6. 607. 919 B1; US 6. 156. 577; US 7. 132. 296. B2; US 2012/02. 76. 645. A1).

Este interés ha tenido impacto directo en campos de la biomedicina, la agroalimentación y la farmacia debido al papel que juegan los antioxidantes en la prevención y la protección contra los procesos de oxidación directamente relacionados con el desarrollo de varias enfermedades (estrés, cáncer, inflamaciones...), el

5 envejecimiento de la piel y el deterioro de la propiedades organolépticas de bebidas y alimentos (F. Shahidi & Y. Zong Eur. J. Lipid Sci. Technol 112 (2010) pp. 930-940)

De forma genérica, el desarrollo de un ensayo *in-Vitro* para la determinación de AOC de una muestra consiste en dos etapas claves.

- 1) La síntesis de un radical sintético, que además de ser estable por lo menos
- 10 durante el ensayo, debe de reaccionar con la mayoría de los antioxidantes independientemente de sus tamaño o solubilidad en el medio de medida.
- 2) La puesta a punto de un método para el seguimiento de la reactividad de este radical con los antioxidantes presentes en la muestra real.

15 En el estado de arte actual se pueden encontrar varios índices o ensayos capaces de evaluar la capacidad antioxidante de una muestra real (P. L. Prior, X. Wu, K. Schaich. J. Agric. Food Chem 53 (2005) pp 4290-4302; R. Apak, S. Gorinstein, V. Böhm, K. M. Schaich, M. Özyürek, K. Güçlü. Pure Appl. Chem 85 (2013) pp. 957-998). La calificación más admitida de esos ensayos depende del mecanismo de neutralización

20 del radical libre mediante el antioxidante presente en la muestra. Siguiendo esa clasificación en el estado de la técnica actual se puede hablar de métodos a base: de transferencia protónica HAT (de Hydrogen Atom Transfer), de transferencia electrónica SET (de Single Electron Transfer) o de una transferencia mixta que oscila entre los dos mecanismos y depende en gran escala de la naturaleza del antioxidante bajo estudio.

25 En el primer grupo "HAT" el mecanismo dominante de neutralización del radical libre sintético se basa en la habilidad de los antioxidantes, generalmente en forma de AH, en "quenchea" el radical libre mediante donación del átomo hidrogeno. Los métodos ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), TRAP (Total Radical-Trapping

30 Antioxidant Parameter) y TOSC (Total Scavenging Capacity) pertenecen a este grupo. En la mayoría de estos métodos, el mecanismo de detección se basa en la habilidad del antioxidante en inhibir la reacción entre un radical libre tipo peroxilo, superoxido, hidroxilo o incluso peroxinitrito y un compuesto destacado por su propiedad ópticas o fluorescente. Los desarrollos descritos en las patentes: WO 2005/

35 02 2116 en posesión de MANNETECH, INC (USA), EP 0. 869. 361. A2 en posesión

TOHOKU ELECTRONIC INDUSTRIAL Co., Ltd (JAPON) o US 6. 06. 342 de Phytochem Technologies Inc, (INGELATERA) pertenecen a este grupo.

En el segundo grupo "SET", el mecanismo de neutralización es puramente electrónico y depende por lo tanto de la balanza del potencial electrodinámico entre el radical libre y el antioxidante o lo que es lo mismo, del poder reductor de la muestra. A este grupo pertenecen principalmente los ensayos FRAP (de Ferric Reducing Antioxidant Power) y CUPRAC (de Copper Reduction Assay). En el primer ensayo se mide la capacidad reductora de la muestra en presencia de un complejo férrico, por ejemplo el Fe^{3+} -TPTZ (férrico 2,4,6-tripiridil-s-triazina) cuyo potencial redox es de 0.7 V/ENH y por lo tanto es capaz de detectar todos los donantes electrónicos con un potencial redox inferior a este valor. La reacción redox en este caso genera un nuevo complejo a base de Fe^{2+} , caracterizado por su color azul intenso a 595 nm.

En el CUPRAC el compuesto base es un ligando de Cu^{2+} que se reduce a su homólogo Cu^{1+} bajo efecto de los antioxidantes de la muestra. El uso de cromóforos como el batocuproine (2,9-dimetil-4,7-difenilo-1, 0-fenantrolina) o el neocuproine (2,9-dimetil-1,10-fenantrolina) con una máxima absorción a 490 y 450 nm respectivamente es muy extendido en este caso. Siguiendo esta tecnología e inmovilizando el ligando cromóforo-metal mediante nafion, se ha conseguido recientemente la invención de un sensor óptico en forma de membrana (US 2012/ 02. 766. 645 A1).

En el tercer grupo, el mecanismo de neutralización del radical se considera mixto aunque no está suficientemente caracterizado. En este caso existen varios ensayos a base de diferentes radicales libres, pero generalmente calibrados con el Trolox (un compuesto similar a la vitamina E) y de ahí la denominación de la mayoría de ellos como TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity). Son los ensayos más encontrados en la bibliografía sobre todo para la caracterización de la capacidad antioxidante de los alimentos y de las formulaciones farmacéuticas. Los radicales comúnmente empleados son el DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) y el ABTS^{*+}

El ensayo con DPPH es fácil de llevar acabo, dado que éste se comercializa en su forma radical y solo hace falta la preparación de su disolución en un disolvente orgánico (metanol por ejemplo), inyectar la muestra o el patrón y leer la bajada de la absorbancia a 515nm para correlacionarla con la AOC. Sin embargo a este ensayo se le han atribuido varias desventajas limitantes. La mayoría de esas limitaciones están relacionadas con las características del radical DPPH (T. Nomura, M. Kikuchi, Y. Kawakami. Biochem. Mol. Biol. Int 42 (1997) pp361-370; M. K. Kalinowski, J. Klimkiewicz. Monatsh Chem 114 (1983) pp1035-1043)

El ensayo TEAC a base del ABTS es sin duda el método más usado para la determinación de la capacidad antioxidante. El ABTS radical es soluble en medios orgánicos e inorgánicos lo cual le hace reactivo con la mayoría de los antioxidantes. Su potencial formal es suficientemente alto (0.68V/ENH), ampliando por tanto el abanico de los antioxidantes a detectar. Por último, su absorbancia máxima se puede medir en varias longitudes de onda: 416, 645, 734 y 815 nm, ventaja que se destaca a la hora de evitar la medida en las longitudes de onda donde la muestra es también absorbente.

Destacando esas ventajas, desde su invención por Miller y sus colaboradores (N. J. Miller, A. T Diplock, C. Rice-Evans, M. J. Davies, V. Gopinathan, A. Milner. Clin. Sci 84 (1993) pp 407-412), varios grupos de investigación se han dedicado a su mejora y adaptación a muestras específicas.

El denominador principal que resume el estado de arte de esta investigación es, la generación y la estabilidad del radical libre ABTS^{•+}, y el estudio de su interacción con los componentes de la muestra.

El radical libre se ha generado, inicialmente, gracias a la mioglobina como biocatalizador y el peróxido de hidrógeno como sustrato. Sin embargo, el orden de adición de la muestra y el ABTS fue discutido, temiendo una reacción no deseada del catalizador con la muestra; lo cual causa una sobrestimación del TEAC si la muestra fuese añadida antes de la generación del ABTS^{•+}, o una subestimación de este índice si no se evita una reacción del catalizador con los antioxidantes de la muestra después de generar el radical libre.

Este tema de los interferentes ha sido sujeto de intensa investigación por varios grupos pioneros. Para eliminar la interferencia positiva, es decir una sobreestimación del AOC, se ha establecido el orden de generar primero el radical libre, medir su absorbancia y finalmente inyectar la muestra real para neutralizar el color generado y correlacionar la bajada de la absorbancia con la AOC (R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Free Radical Biol.Med. 26 (1999) pp-1231-1237; R. Van den Berg, G. R. M. M. Haenen, H. Van den Berg, A. Bast, Food Chem 66 (1999) pp-511-517.). Como se puede imaginar, el establecimiento de este orden no solucionó el problema de manera eficiente, porque ello no impide una reacción de los antioxidantes con el catalizador y el peróxido, lo cual da lugar asimismo a una subestimación de la AOC.

Actualmente en los KIT comerciales se usa una disolución de bloqueo para inhibir la reacción enzimática. Sin embargo, en algunos KIT esta disolución de bloqueo se

añade después de generar el ABTS radical y antes de añadir la muestra, pero en otros se añade después de inyectar la disolución enzimática sobre una mezcla de la muestra y de ABTS. Por lo cual se puede deducir que el aspecto de interferencias positivas o negativas no se ha considerado hasta hoy en día en esos KIT comerciales.

- 5 Debido a la importancia de este problema algunos grupos han probado varias enzimas y proteínas y han controlado estrictamente la composición del medio para la regeneración del radical libre. El trabajo más completo en este sentido y por su puesto el más usado en la bibliografía, es el trabajo publicado por Arnao et al (M. B. Arnao, A. Cano, J. Hernadez-Ruiz, F. Garcia-Canovas, M. Acosta. Anal. Biochem 236 (1996) pp255-261). En este trabajo se ha usado la enzima HRP (peroxidasa de rábano picante) y se ha optimizado la composición del cóctel para generar un ABTS radical estable, por lo menos durante la medida, como sigue: $[H_2O_2] = 2 [ABTS^{*+}]$; $[ABTS^{*+}] < [ABTS]/50$ o lo que es lo mismo $[H_2O_2] < [ABTS]/100$.

- 15 El primer coeficiente fue optimizado para que la molaridad del peróxido fuese limitante totalmente consumida y sea limitante para una posible reacción de la enzima con la muestra. Mientras que el porcentaje radical/sustrato se ha optimizado considerando el equilibrio de dismutación resumido en la Figura 1, y asumiendo el hecho de que poniendo la concentración del ABTS en abundancia este equilibrio se desplazará hacia la generación del $ABTS^{*+}$.

- 20 Sin embargo y como se describe en la misma Figura 2, la estabilidad del radical libre puede que se vea afectada también por el fenómeno de azodicación o sobre-oxidación descrito inicialmente por Childs y Bardsley (R. E. Childs and W. G. Bardsley. Biochem. J. 145 (1975) pp 93-103). Desafortunadamente esta reacción no se ha considerado nunca en los estudios de la estabilidad del radical libre $ABTS^{*+}$. De hecho, todos los métodos existentes en la bibliografía o en el mercado no aseguran una estabilidad del radical libre por más de diez horas.

Según resultados de nuestra investigación este fenómeno y otro relacionado con la degradación de la proteína presente en la disolución, afectan en gran escala la estabilidad del radical libre.

- 30 En este sentido el uso de oxidantes químicos para generar el ABTS radical puede que sea eficiente. El persulfato de potasio es uno de los oxidantes más usado en la bibliografía. Aunque su reacción con el ABTS es muy larga, mínimo 12 horas, genera un radical libre relativamente estable pero no por más de tres días. Este corto tiempo es debido posiblemente a que se evita la contaminación de la disolución con los productos de degradación de la enzima, pero no el otro causante de la inestabilidad (la

azodificación).

En resumen, el estado de arte de los ensayos TEAC a base del ABTS radical se caracteriza por dos problemas clave:

- 5 ✓ La reacción del catalizador con la muestra provocando medidas subestimadas o sobrestimadas según el orden de adición de la muestra y el ABTS.
 ✓ La inestabilidad del radical libre durante un período que permita su comercialización.
- 10 Desde nuestro punto de vista, a pesar de las grandes ventajas reconocidas a este ensayo, esos dos problemas impiden su divulgación y uso por analistas profesionales. Efectivamente, en el estado de la técnica actual el profesional está obligado a sintetizar el radical libre en su laboratorio a partir de varios reactivos. La concentración de esos reactivos ha de ser estrictamente etiquetada o incluso previamente
15 determinada por él mismo.
De hecho, para realizar los ensayos TEAC en un laboratorio, solo existen dos opciones en el estado actual de la técnica.
 ✓ La preparación de las disoluciones de síntesis en el laboratorio a partir de reactivos según procedimiento del artículo; Anal. Biochem 35 (1996) pp255-
20 261, citado antes y otros relacionados. En este caso el operador se ve obligado a preparar más de seis reactivos y controlar estrictamente su concentración. Es obvio que esta opción requiere personal muy cualificado en química analítica para llevar a cabo dicho control. Otra desventaja de esta opción es su consumo considerable de tiempo, aparatos y reactivos.
- 25 ✓ La compra de KIT comerciales. Es una opción técnicamente similar a la primera con una única diferencia: aquí los reactivos vienen valorados por la casa comercial. El KIT en este caso consiste como mínimo en:
 1. Disolución tampón para disolver la enzima
 2. Extracto de la enzima, previamente valorado por la casa comercial
 - 30 3. ABTS en forma de tabletas o en polvo, previamente valorado por la casa comercial.
 4. Disolución de bloqueo de la reacción enzimática
 5. Disolución de peróxido de hidrógeno, previamente valorada por la casa comercial
 - 35 6. Tabletas o frascos de Trolox o cualquier patrón
 7. La disolución de medida

El operador en este caso solo tiene que seguir las pautas marcadas por el fabricante, considerándose aun así que son ensayos bastante largos y caros. Para ahorrar en el precio de medida el uso de un espectrofotómetro de múltiplaca es obligatorio. Además, algunos reactivos no son estables a temperatura ambiente y hay que transportarlos en frío (-20°C), lo cual encarece más el precio de esta opción.

La aportación científica de esa invención se puede resumir en dos aspectos:

1. De una parte comunica una síntesis del ABTS^{•+} sin necesidad de la disolución de bloqueo y sin contaminar la disolución con los extractos del catalizador lo cual elimina el problema de interferentes de forma eficiente.
2. De otro lado comunica una manera de almacenamiento del ABTS^{•+} durante largo tiempo, más de 3 meses.

Ambos aspectos tienen como objetivo solucionar los problemas que marcan el estado de la técnica y facilitar por lo tanto un uso extendido de los ensayos TEAC.

Por lo tanto, con esta invención se pretende proporcionar al operador otra opción más práctica. Se trata de un KIT sencillo para la medida de la capacidad antioxidante que será compuesto, como mínimo de un solo componente y de dos componentes como máximo si así lo desea el operador.

1. Una disolución estable del radical libre ABTS^{•+} lista para su uso. (es el objeto de esta invención)
2. Un frasco de reactivo patrón (Opcional)

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

En esta invención se describe por primera vez un procedimiento de síntesis y almacenamiento del radical libre ABTS^{•+} y su uso para la determinación de la capacidad antioxidante en muestras de interés.

En esta invención se consigue la síntesis del radical ABTS^{•+} estable por más de tres meses.

El radical ABTS^{•+} sintetizado y almacenado según esta invención está listo para su uso como cromóforo en las medidas de la capacidad antioxidante total de una muestra.

A diferencia del estado de arte de la técnica donde el operador está obligado a sintetizar el radical ABTS^{•+} en su laboratorio a partir de reactivos valorados previamente por él mismo o por casas comerciales que le proporcionan KIT para realizar estos ensayos, la aplicación industrial de esta invención proporcionará este radical en una disolución estable con el tiempo.

Por lo tanto los aspectos fundamentales de esta invención son:

- La síntesis del radical libre ABTS^{•+} y su aislamiento de los catalizadores que se han usado para su generación a partir del ABTS.
- 5 • El proceso de estabilización de este radical durante largo tiempo
- El uso de este radical para la medición de la capacidad antioxidante en muestras de interés.

En una aplicación preferida se usan los catalizadores bioquímicos para la generación del radical libre. Esos catalizadores puede que sean enzimas típicas, como son la peroxidasa del rábano picante (HRP), la lacasa y similares o proteínas como la hemoglobina o la mioglobina. En todo caso esos catalizadores deben de ir inmovilizados en un soporte extraíble para eliminarlos de la disolución del radical libre resultante.

15 Según el catalizador usado, a la disolución de síntesis habrá que añadirle el sustrato enzimático, peróxido de hidrógeno en los casos de la HRP y la mioglobina por ejemplo.

En una aplicación preferida, al final de la reacción de la síntesis se extrae el biocatalizador de la disolución de síntesis para evitar una posible reacción de los antioxidantes de la muestra con el catalizador.

En una aplicación preferida el catalizador bioquímico se inmoviliza mediante métodos convencionales en la superficie de microesferas magnéticas, lo cual facilita su extracción mediante uso de un imán al final de la reacción.

En otra aplicación preferida el biocatalizador se inmoviliza en la superficie de partículas metálicas mediante métodos convencionales de inmovilización de proteínas, lo cual facilita su extracción del medio al final de la reacción mediante simple centrifugación.

En otra aplicación preferida se puede usar un biorreactor para la síntesis del radical libre ABTS^{•+} mediante biocatálisis donde las enzimas o las proteínas se encuentran inmovilizadas en un soporte inerte (definido así porque su composición no interfiere en el proceso bio-catalítico, sirve solo para retener las proteínas en su estado activo y facilita la separación entre el biocatalizador y el medio de reacción). Al final de esa reacción se extrae el radical libre del biorreactor, obteniendo asimismo una disolución

libre de extractos de proteínas.

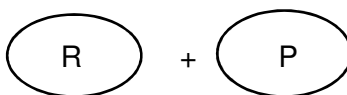
En otra aplicación preferida, siempre para asegurar la no contaminación de la disolución del ABTS^{•+} sintetizado con los residuos del biocatalizador, se puede incluso recurrir a métodos de separación física convencionales. Esos métodos se han definido así porque se basan en la diferencia de las propiedades físicas del biocatalizador y del resto de los componentes del medio de la reacción. Entre estos métodos podemos citar la centrifugación, la diálisis, la cromatografía, etc.

En otra realización preferida, la síntesis del radical libre puede llevarse a cabo mediante catalizadores químicos tipo dióxido de magnesio o persulfato potásico. En este caso la concentración del catalizador ha de ser estrictamente controlada para que sea consumido en su totalidad durante la reacción.

En una aplicación preferida, para evitar la reacción de azodificación descrita en la Figura 1 al final de la reacción de síntesis del radical libre, se elimina el oxígeno del medio mediante borboteo de un gas inerte como son el nitrógeno, argón, helio o similares.

En una realización preferida el radical sintetizado se almacena bajo presión del mismo gas inerte en un frasco hermético para protegerlo del oxígeno y de la luz.

Realizando estos procedimientos, el aspecto práctico de esta invención se refiere a un KIT para medir la capacidad antioxidante a base del ABTS radical sintetizado según las descripciones antes citadas. Este KIT irá compuesto en forma general de:



Dónde:

- R es una disolución estable del radical libre ABTS^{•+} y es la aportación clave de esta invención.
- P es un patrón de calibración del método

En la presente invención, se entiende por la disolución estable del radical libre ABTS^{•+} una disolución colorada sintetizada a partir del compuesto ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico), con absorbancias máximas en las longitudes de onda

416, 645, 734 y 815 nm. Esta disolución está preparada para reaccionar directamente con los antioxidantes presentes en la muestra. La bajada en la absorbancia de este radical en presencia de los antioxidantes es proporcional a la capacidad antioxidante de la muestra. La proporcionalidad entre la bajada de la señal y la capacidad antioxidante de la muestra se puede cuantificar con el reactivo B, que es un patrón tipo Trolox, ácido gálico, ácido ascórbico, cisteína, glutatión o similares.

Otro aspecto fundamental de esta invención se refiere a un procedimiento de medida de la capacidad antioxidante en muestras de interés que se puede llevar a cabo según los tres procedimientos descritos a continuación.

Procedimiento 1:

- a. Abrir el bote del radical ABTS^{•+} sintetizado y almacenado según las aplicaciones antes descritas
- b. Diluir este radical en una disolución tampón si es necesario
- c. Verter la misma cantidad de esta disolución en varias cubetas de espectrofotometría, y añadir una cantidad exacta de un patrón a diferentes concentraciones, concentración 0 incluida.
- d. Esperar a que la reacción proceda un periodo de tiempo concreto T. Leer la absorbancia de este radical en una longitud de onda concreta (416, 645 o 734 nm por ejemplo)
- e. Establecer una recta de calibrado (mediante método de mínimos cuadrados) a partir de las señales obtenidas y las concentraciones del patrón.

De forma generalizada y no limitante la recta tendrá la siguiente forma:

$$A = A_0 - m [C]$$

Dónde: A es la absorbancia, A_0 la ordenada de la curva, m es la pendiente, y [C] es la concentración.

- f. Preparar la muestra real según convenga (extracción en caso de muestra sólida, dilución en agua si se precede, etc.) inyectar el extracto líquido en una cubeta de espectrofotometría que contiene la misma cantidad de ABTS radical como en la etapa (c), esperar el mismo tiempo T establecido en la etapa (d) y leer la absorbancia como en (d). Esto dará una lectura de absorbancia que será A_x .

- g. Calcular la capacidad antioxidante a partir de la recta de calibración y A_x , lo cual se hará siguiendo la fórmula:

$$AOC = \frac{A_0 - A_x}{m}$$

- 5 y tendrá las unidades de “ppm patrón equivalente, por ejemplo (siempre y cuando la calibración fue establecida con estas unidades de patrón).

Procedimiento 2:

- 10 Otro procedimiento de medida más simple puede que sea usando solo una medida de patrón; es decir sin necesidad de preestablecer una recta de calibración. En este caso el procedimiento puede que sea como sigue:

- a. Abrir el bote del radical ABTS^{•+} sintetizado y almacenado según las aplicaciones antes descritas
- b. Diluir este radical en una disolución tampón si es necesario
- c. Verter la misma cantidad de esa disolución en dos cubetas de espectrofotometría, leer en el mismo momento la absorbancia en una longitud de onda (416, 645 o 734 nm por ejemplo) frente a una cubeta de blanco que fue previamente rellenada con la misma disolución tampón usada en la etapa b. Esas lecturas se anotaran como A_1
- d. Añadir a una cubeta un volumen de una disolución patrón de concentración predeterminada y a la otra cubeta el mismo volumen de la disolución de la muestra a analizar.
- e. Agitar y esperar un tiempo T exacto para las dos cubetas, leer la nueva absorbancia frente al mismo blanco en la etapa c. Las dos lecturas serán anotadas como A_{2m} y A_{2est} .
- f. Calcular la capacidad antioxidante según la fórmula:

$$AOC = \frac{\Delta A_m}{\Delta A_{est} / C_{est}} \times F$$

Donde : $\Delta A_m = A_{2m} - A_{1m}$; $\Delta A_{es} = A_{2es} - A_{1es}$, C_{est} es la concentración del estándar y F es el factor de dilución.

30 Procedimiento 3:

Para ahorrar en reactivos y analizar varias muestras en el mismo tiempo, se puede usar un lector espectrofotométrico multiplacas. Para ello se pueden seguir las siguientes pautas:

- a. Abrir el bote del radical $ABTS^{+}$ sintetizado y almacenado según las aplicaciones antes descritas
 - b. Diluir este radical en una disolución tampón si es necesario.
 - c. Inyectar la misma cantidad de esa disolución en cada microcubeta.
 - 5 d. Añadir una cantidad exacta de un patrón a diferentes concentraciones, concentración 0 ppm incluida, en algunas placas y al resto añadir la misma cantidad de las muestras a analizar.
 - e. Meter la multiplaca en el lector espectrofotométrico y esperar un tiempo T para leer la absorbancia correspondiente en cada microcubeta.
 - 10 f. Establecer una recta de calibrado mediante los valores correspondientes a las cubetas del patrón como en procedimiento 1.
 - g. Traducir la absorbancia de cada muestra a su AOC correspondiente según la fórmula del procedimiento 1 etapa g.
- 15 Dado que los datos de análisis de las muestras reales determinados mediante los procedimientos descritos se correlacionan directamente con el contenido polifenólico determinado según Folin-Ciocalteu. El KIT descrito en esta invención se usará también para la determinación del contenido polifenólico de una muestra real.
- Para ello solo hace falta expresar los datos obtenidos según los procedimientos
- 20 anteriores usando el patrón equivalente preferible para el método Folin-Ciocalteu.

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

25 invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 30
- Figura 1: esquema de la reactividad de ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) y su radical libre.
- Figura 2: espectro de absorbancia del medio de reacción antes y después de la
- 35 síntesis del radical libre $ABTS^{+}$ según invención

Figura 3: estabilidad del radical libre en contacto con el oxígeno, durante más de 60min.

5 Figura 4: estabilidad, durante más de 90 días, del radical libre sintetizado y almacenado según invención.

Figura 5: calibración típica del patrón ácido gálico usando el radical libre sintetizado según ejemplo 1

10 Figura 6: calibración típica del patrón Trolox usando el radical libre sintetizado según ejemplo 1

15 Figura 7: correlación entre el índice $TEAC_y$ de varios vinos de la región, determinado según ejemplo 1 (eje Y) y el $TEAC_x$ determinado según método de la bibliografía Anal. Biochem 35 (1996) pp255-261 y artículos relacionados (eje X).

20 Figura 8: correlación entre el índice TEAC (expresado en mM gálico equivalente) de varios vinos de la región determinado según ejemplo 1 (eje Y) y el índice polifenólico total de los mismos vinos (expresado en mM gálico equivalente) determinado según método Folin-Ciocalteu (eje X)

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

25 Para la realización de esta invención se han seguido las siguientes pautas de síntesis y de medida.

1. Síntesis del radical libre

La síntesis del radical libre estable fue gracias al uso de nanoesferas magnéticas funcionalizadas con HRP.

30

1. 1. Síntesis de nanoesferas magnéticas funcionalizadas con la enzima HRP.

Las nanoesferas magnéticas usadas fueron de tipo SiMAG-Amine de la casa chemicell GmbH Berlin Germany, de un diámetro medio de 200nm y dotadas con un grupo amino en su superficie. Esas nanoesferas vienen suspendidas en una disolución estabilizadora, por lo que antes de funcionalizarlas con la enzima HRP, se coge una cantidad de 400 μ L se colocan en un tubo de ensayo y se coloca un imán en las

35

paredes del tubo, inmediatamente y bajo efecto del campo magnético las nanopartículas se aglomeran en la pared del tubo que está en contacto con el imán, este fenómeno permite la extracción de la disolución estabilizadora mediante una simple pipeta y facilita el proceso de lavado siguiendo el mismo proceso.

- 5 Para el lavado se ha usado una disolución de tampón MES 0,1 M a pH 6 preparada a partir del ácido 2-(N-Morfolino) etanosulfónico (M3671 Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) y ajustada a este pH mediante una disolución concentrada de sosa. Después de tres lavados y extracción del sobrenadante mediante pipeta e imán, se suspende las nanopartículas en una disolución de 0,250 mL del mismo tampón y 10mg de 1-ethyl-3-
- 10 (3-dimethylaminopropyl) carbodiimida (E6383 **Sigma-Aldrich** St. Louis, MO, USA) y se procede a una homogenización del medio mediante una agitación orbital. Pasados 5 minutos aproximadamente, se añade una disolución de 1 mg de la enzima peroxidasa de rábano picante (enzyme commission numero 1.11.1.7; **P8375 Sigma-Aldrich** St. Louis, MO, USA) disuelta en 0,5mL de MES a pH 6. La reacción de
- 15 establecimiento del enlace covalente entre los grupos carboxilos de la enzima y el grupo amino terminal de la nanoesferas se realiza dejando los componentes, (nanoesferas-NH-EDC-⁻OOCHRP) del medio en agitación orbital continua durante un tiempo mínimo de 3 horas.

- Terminado este tiempo, las nanoesferas ya funcionalizadas con el biocatalizador se
- 20 lavan (tres veces) con una disolución tampón fosfato pH 7; preparado a partir de una mezcla de fosfato de potasio bibásico y fosfato de potasio monobásico (60220 y 60356 respectivamente de Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) y se conservan en la disolución de bloqueo: 1mL de buffer fosfato a pH 7 que contiene 0,1 % p/v de albúmina de suero bovino (A2153, Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) y 0.05 % p/v de
- 25 azida sódica (**S2002**, Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA). Se ha comprobado que las nanoesferas así funcionalizadas y conservadas guardan su actividad biocatalítica durante un mínimo de 15 días si están almacenadas en la nevera a 4°C

1.2. Síntesis de la disolución del radical libre ABTS^{•+}

- 30 Para la síntesis del radical libre se necesitaron las siguientes disoluciones:
- ✓ Tampón glicina 0,1 M a pH 4,4. Se prepara disolviendo 0,75 g de este compuesto (**G7126** Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) en 10mL de agua Mili-Q y ajustando el pH con ácido clorhídrico concentrado
 - 35 ✓ Una disolución de peróxido de hidrogeno a 10mM; 115µL de peróxido de hidrogeno concentrado a 30% p/v (121076 Panreac Barcelona España) en

100mL de agua Mili-Q. Aunque esta solución es estable con el tiempo, es mejor añadirle 2 μ L de clorhídrico 0,5M para asegurar más su estabilidad.

- ✓ Y 137,16 mg de ABTS 2,2'azinobis (3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico) en forma de sal di-amonio, (A1888 Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA). Esta cantidad de ABTS se disuelve en menos de 50mL de la disolución de glicina y se coloca en un matraz aforrado.

Antes de proceder a la síntesis, es preferible comprobar la actividad catalítica de las nanoesferas funcionalizadas con HRP. Para ello se coge una cubeta espectrofotométrica de cuarzo de 1ml, se verta en ella 1mL de la disolución de ABTS recién preparada y se le añade 1 μ L de la disolución de peróxido 10mM. A esta disolución se le pasa un barrido espectral UV-Vis desde 300nm hasta 1000nm. Se ha usado un espectrofotómetro equipado con el detector HR4000 de Ocean optics (Dunedin, Florida, USA), conectado a la celda con fibra óptica y dotado de software OceanView de la misma casa para la adquisición y procesamiento de los datos.

La primera medida da como resultado el espectro₁ (Espect₁) de la figura 2. En este espectro solo se aprecia la existencia de un pico a $\approx$ 380nm característico del compuesto ABTS presente en la cubeta. Inmediatamente se verta el contenido de la cubeta en un tubo de ensayo se le añade 1 μ L de las nanoesferas y se espera 2min aproximadamente. Después se extraen las nanoesferas mediante fuerzas de atracción magnética y se vuelve a poner el sobrenadante en la misma cubeta; la disolución en este caso cambia totalmente de color y coge un tono azul muy intenso. Se pasa un barrido espectrofotométrico en las mismas condiciones, lo cual da como resultado el espectro 2 (Espect₂) de la figura 2. En este espectro se aprecia, además del pico inicial a 380nm, característico del ABTS reducido, la aparición de otros picos a $\approx$ 416, 645, 734 y 815 nm característicos del ABTS radical (R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Free Radical Biol.Med. 26 (1999) pp-1231-1237). Este ensayo demuestra que las nanoesferas están catalíticamente activas y asegura su uso para la síntesis del ABTS radical.

Al matraz de 50mL que contiene glicina y ABTS inicialmente, se le añade 250 μ L de la disolución de peróxido de hidrogeno 10mM y 1ml de nanoesferas funcionalizadas con HRP previamente lavadas como en etapas anteriores pero esta vez con glicina. Se verta el contenido en un recipiente de vidrio opaco y se sella con un tapón de caucho. En el tapón del recipiente se introducen dos agujas de jeringuilla, una de ellas conectada a un tubo de flujo de nitrógeno en su extremo y la otra sirve de escape para este gas. Lo cual se introduce en la disolución durante un tiempo mínimo de 30min y

sirve para expulsar todo el oxígeno del medio y asegurar una síntesis bajo nitrógeno. Pasado este tiempo, se procede a la extracción de la disolución mediante una jeringuilla. Para no extraer las nanoesferas y tener una disolución de ABTS radical libre de extractos de proteína, se usa el imán para retener los nanomateriales en el fondo del recipiente.

2. Estabilidad del radical libre y método de almacenamiento

La disolución extraída se inyecta en tubos de almacenamiento de vidrio opaco, totalmente sellados con un tapón de caucho donde se introducen dos agujas para barbotear el nitrógeno durante un tiempo mínimo de 5min. Después de este tiempo, se extrae la aguja de escape y se deja la de alimentación de nitrógeno durante medio minuto. Respetando este orden la disolución de ABTS radical se queda almacenada en su recipiente sin trazas de oxígeno y bajo nitrógeno durante largo tiempo.

La estabilidad del radical libre, así sintetizado y almacenado, se ha demostrado teniendo en cuenta dos aspectos; la estabilidad durante la medida de la capacidad antioxidante y la estabilidad durante el tiempo de almacenamiento. En ambos casos la metodología a seguir fue la medida de la absorbancia del radical libre a una longitud de onda característica del radical libre.

En una cubeta de medida de espectrofotometría de 1mL se colocan 250µL de la disolución del radical libre sintetizado según descripción interior y 750µL de tampón glicina, se agita la mezcla y se espera un tiempo de 2min para homogenizar el medio. A continuación se procede a la medida de absorbancia a una longitud de onda fija igual a 416 nm usando la disolución de glicina como blanco. Para esas medidas se ha usado el espectrofotómetro Zuzi UV-4200, comercializado en España por Auxilab SL Berrián Navarra.

Para demostrar la estabilidad durante el ensayo, a esta misma cubeta y a varios iguales cuyo contenido fue extraído de otros botes, se le han realizado varias medidas durante un tiempo de 60min. El resultado de esos ensayos está presentado en la figura 3.

En esta figura se presenta la media de esas medidas frente al tiempo pasado desde la apertura de los botes del radical libre sintetizado según la invención. Es obvio que en esta figura se aprecia claramente la durabilidad del radical libre durante un tiempo excesivamente suficiente para la realización de cualquier ensayo de medida de la capacidad antioxidante.

El otro aspecto de estabilidad fue realizado de la misma manera, pero usando varios botes del radical libre. El contenido de esos botes fue sintetizado el mismo día y en las mismas condiciones antes descritas. La única diferencia entre esos botes fue el tiempo de almacenamiento, por lo que el resultado de esos ensayos se ha presentado en forma de media de absorbancia de cada bote frente al tiempo recurrido desde su síntesis.

La figura 4, presenta esos datos e ilustra claramente la eficacia del método de almacenamiento descrito en esta invención para preservar el radical libre ABTS^{•+} en su estado inicial después de más de 90 días desde su síntesis.

3. Aplicación analítica de la invención

Para demostrar la aplicabilidad de la invención en la determinación de la capacidad antioxidante de muestras reales, se han realizado tres ensayos:

- ✓ Medida de la capacidad antioxidante con el método de la invención en varios vinos
- ✓ Medida de la capacidad antioxidante con método de la bibliografía y su correlación con los datos de nuestro método.
- ✓ Medida del contenido de polifenoles totales en las mismas muestras mediante el método de Folin-Ciocalteu y su correlación con la capacidad antioxidante determinada según nuestro método.

3.1. Aplicación del método de la invención para medir la capacidad antioxidante en vinos

Para la determinación de la capacidad antioxidante en vinos se han usado varios vinos comprados directamente del supermercado. Se han analizado vinos de diferentes características (15 tintos, 5 blancos, 2 rosados, 2 cava y 1 bebida aromática elaborada a base de vino tinto). Además, según viene etiquetado en la botella, las muestras analizadas proceden de uvas variadas y fueron elaboradas de manera significativamente diferente.

Por lo tanto los datos presentados a continuación demostrarán la validez del método de la presente invención para el análisis de la capacidad antioxidante en vinos y bebidas similares. Más aún, teniendo en cuenta la complejidad de esas muestras reales, la viabilidad de este método se puede extrapolar a cualquier muestra real menos compleja. Por el momento el resto de las muestras agroalimentarias y las

muestras biológicas o de formulación farmacéutica.

El procedimiento de determinación de la capacidad antioxidante en vinos fue realizado como sigue:

Primero se preparan los patrones de medida y la muestra. Se han usado dos patrones el ácido gálico (16303 AVOCADO Research Chemicals Ltd Heysham Lancs UK) y el Trolox; 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (238813 Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA). Para su preparación se pesa 1,32 mg de gálico y 1,75 de Trolox, se disuelven primero en 1ml de etanol absoluto y se enrasa a 5mL con glicina a pH 4,4 preparada como en el párrafo 1.

En el caso del gálico se han preparado a partir de la disolución madre una tira de disoluciones con volumen total de 560 μ L y concentraciones iguales a 0; 0,020; 0,040; 0,080; 0,100 y 0,200 mM, para ello se cogieron respectivamente 0, 8, 16, 32, 40 y 80 μ L de la disolución madre y se completó el volumen total con una mezcla de etanol y tampón glicina (20/80 v/v).

En el caso del Trolox las concentraciones finales de la tira de patrones fue la siguiente: 0; 0,010; 0,040; 0,100; 0,200; 0,400 y 0,600 mM; para ello había que coger respectivamente un volumen de la disolución madre igual a: 0, 4, 16, 40, 80, 320 μ L y llevar el contenido del tubo de ensayo hasta 560 μ L completando con la mezcla de etanol y tampón glicina.

Las muestras de vino se han preparado mediante una simple dilución de cada vino en la misma mezcla de etanol y tampón glicina (20/80 v/v), los factores de dilución fueron optimizados en 200 para vinos tinto y 20 para vinos blancos y cavas.

La medidas de la capacidad antioxidante del conjunto de esas muestras fue realizada en un lector espectrofotométrico multiplaca (POLARstar Omega Multi-Mode Microplate

Reader; BMG LABTECH, Ortenberg, Germany), después de abrir el bote del radical libre sintetizado y almacenado según procedimiento anterior, se ha diluido su contenido dos veces con el tampón glicina a pH 4,4 y se colocó en los 96 pocillos de la placa 180 μ L de esta disolución. Inmediatamente se ha inyectado en cada pocillo 20 μ L de la muestra de vino o de patrón antes preparados. De este modo se han llenado 2 pocillos para cada muestra y 3 para cada concentración de los dos patrones. El resto de los pocillos se completó a 200 μ L con la disolución de ABTS^{•+} (los datos de esos pocillos sirven solo como control y no se usaron en el cálculo de la recta de calibrado). Una vez rellanados todos los pocillos se introduce la bandeja y se procede a la lectura de la bajada de la absorbancia a 416nm en todos los pocillos después de 4min.

Este proceso se ha repetido dos veces la media de los resultados de los pocillos de los patrones fue presentada como recta de calibrado mediante método de mínimos cuadrados tal como lo ilustra la figura 5 para el ácido gálico y la figura 6 para el

Trolox. La pendiente y la ordena de esta última curva se han usado para calcular el

índice TEAC de cada muestra según la fórmula: $TEAC = \frac{A_x - A_0}{m} \times F$

Dónde A_x es la absorbancia de la muestra x, A_0 es la ordenada de la recta de calibración, m es la pendiente y F es el factor de dilución; 200 para los vinos tintos y 20 para los vinos blancos.

Los resultados obtenidos para cada muestra, su error de medida y las características destacadas de cada vino se resumen en la siguiente tabla:

	Muestra	TEAC mmol L ⁻¹
1	Bebida aromática. Tino 90%	14,68±0.21
2	Tinto Crianza 2008. Garnacha /Tempranillo	37,43±0.11
3	Tinto Navarra 2011. Tempranillo	29,66±1.53
4	Tinto Ribera Duero (Cosecha)	41,37±1,26
5	Tinto Ribera Duero 2012. Tempranillo	30,76±1.77
6	Tinto Crianza 2007. Tempranillo. Cabernet Sauvignon	32,36±3.91
7	Tinto Reserva	31,51±0.20
8	Tinto Crianza 2010. Tempranillo	24,52±0.06
9	Tinto 2012. Cabernet Sauvignon	22,52±1,03
10	Tinto 2012. Tempranillo / Garnacha Syrah	29,32±1,60
11	Tinto Crianza 2009. Tempranillo	30,03±0.31
12	Tinto Joven 2012. Monastrell	22,05±0.05
13	Tinto Reserva 2009. Tempranillo	27,08±1,16
14	Tinto	35,86±0.02
15	Tinto 2012	8,44±0.02
16	Tinto Garnacha 2012	28,46±0.03
17	Rosado gasificado	4,65±0.01
18	Rosado 2012	7,08±0.01
19	Cava Brut	2,34±0.02
20	Cava Brut Nature	1,18±0.01
21	Blanco 2012 Viura y Airén	1,82±0.04
22	Blanco. 2012	3,01±0.20
23	Blanco	1,28±0.01
24	Blanco 2013. Chenin Blanc	1,15±0.01
25	Blanco 2013. Verdejo y Viura	1,86±0.01

3.2. Correlación entre el método de la invención y el método bibliográfico

A falta de un método estándar para medir la capacidad antioxidante, se ha tomado como referencia el método optimizado por Arnao et al (M. B. Arnao, A. Cano, J. Hernández-Ruiz, F. García-Canovas, M. Acosta. Anal. Biochem 236 (1996) pp255-261) y los artículos relacionados. En este método la síntesis del radical libre se hace

en el mismo momento de medida gracias a la enzima peroxidasa de rábano picante y el peróxido de hidrogeno. Sin embargo como hemos citado antes, este método se basa en el control estricto de la concentración de la enzima del sustrato y del ABTS. Para ellos y siguiendo la recomendación de los autores, se ha corregido el etiquetado de las disoluciones usando el coeficiente de extensión de cada compuesto; $\epsilon_{340nm} = 36,000M^{-1} cm^{-1}$ para el ABTS, $\epsilon_{403nm} = 100,000M^{-1} cm^{-1}$ para la enzima peroxidasa de rábano picante y $\epsilon_{240nm} = 43.6 M^{-1} cm^{-1}$ para el para el peróxido de hidrogeno. En todos los casos, se coge una cantidad exacta de cada compuesto se diluye en un mililitro de tampón glicina y se mide la absorbancia de cada disolución en su longitud de onda correspondiente. El resultado de cada medida se divide por el coeficiente de extensión del compuesto para dar la concentración real que corresponde a la cantidad antes cogida.

Usando esos nuevos datos se han preparado las tres disoluciones:

- ✓ Disolución de ABTS reducido a 50mM, preparada en tampón glicina.
- ✓ Disolución de HRP a 50 μ M en tampón glicina
- ✓ Disolución de peróxido de hidrogeno a 200 μ M en el mismo tampón

La medida de la capacidad antioxidante, según este método, fue adaptada al lector multiplica como sigue:

Se ha preparado una mezcla de un volumen total de 20mL de las disoluciones de ABTS, HRP, glicina y peróxido 0,6; 0,1; 1,5 y 17,8mL respectivamente. Este coctel se ha usado, como si fuera una disolución de radical. Es decir, después de que se estabilice la señal del radical libre generado, se añaden 20 μ L de la muestra y del Trolox preparados tal como en el párrafo anterior. Los datos de la absorbancia se cogieron depuse de 4min.

Con los valores de absorbancia de los pocillos del patrón se estableció la recta de calibrado y los valores de la muestra se han traducido al TEAC correspondiente. El resultado de la correlación de los datos obtenidos y los índices obtenidos según nuestro método se ilustran en la figura 7.

3.3. Correlación entre el Índice Folin-Ciocalteu y la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de una muestra de vino se ha correlacionado desde siempre con su contenido polifenólico total. Teniendo en cuenta este hecho, consideramos que es de interés realizar medidas del contenido polifenólico total de las

muestras analizadas por el fin de ver la correlación existente entre este índice y el índice de la capacidad antioxidante determinado mediante el método de la invención.

Para la determinación del contenido fenólico (IPF) se ha usado el método espectrofotométrico desarrollado por Folin-Ciocalteu (F-C). Para ello se ha usado el reactivo de F-C comercial (251567 Panreac, Barcelona España) y una disolución de carbonato sódico a 20% p/v preparada a partir de carbonato de sodio anhidro (S2127 Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA).

Brevemente, en un matraz aforrado de 10mL se introducen, respetando el siguiente orden, 0,1 mL de muestra de vino (tinto diluido 1/5 y blanco sin diluir) o de patrón gálico previamente preparado como en los párrafos anteriores, 5mL de agua Mili-Q, 0,5 mL de reactivo F-C, 2mL de la disolución de carbonato y se enrasa a 10mL con agua Mili-Q. Se agita el matraz para homogenizar, se espera 30min y se mide la absorbancia a 750 nm frente a un blanco preparado con agua Mili-Q

Finalmente se determina el IFC teniendo en cuenta el factor de dilución de cada muestra (20 para blanco y 100 para tintos). Este índice se ha traducido a gálico equivalente mediante la curva de calibrado determinada a partir de los resultados de este patrón y la correlación de esos resultado y la capacidad antioxidante expresada también en gálico se encuentran ilustrados en la figura 8.

En esta figura se aprecia claramente una correlación perfecta entre el índice Folin-Ciocalteu usado como método estándar para la determinación del contenido polifenólico de una muestra y el índice de la capacidad antioxidante determinado según nuestra invención. La presentación estadística de los resultados de esos dos métodos ha dado una correlación lineal con un coeficiente de 0,95, con una ordenada centrada en un valor nulo y una pendiente que no sale de uno con un intervalo de confianza de 95%.

Esos datos demuestran que el método de la siguiente invención es viable también para expresar el contenido fenólico de una muestra.

REIVINDICACIONES

- 5
1. Procedimiento de síntesis y almacenamiento de radical libre ABTS^{•+}, para la determinación de la capacidad antioxidante en muestras de interés, donde se usan catalizadores extraíble después de finalizar la síntesis u oxidantes consumibles en su totalidad y la disolución resultante se almacena protegida de la luz y bajo presión de un gas inerte.

- 10
2. Disolución de radical libre ABTS^{•+} estable durante largo tiempo, sintetizada según reivindicación 1 y caracterizada por; su color azul intenso y su absorbancia máxima a longitudes de onda iguales a 416, 645, 734 y 815 nm. Esta disolución no contiene catalizadores ni oxidantes y está protegida de la luz y del aire.

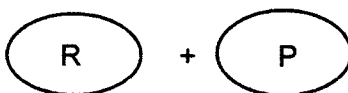
- 15
3. Procedimiento de síntesis de radical libre ABTS^{•+}, según reivindicación 1, donde se usan biocatalizadores extraíbles después de finalizar la síntesis y la disolución resultante se almacena protegida de la luz y bajo presión de un gas inerte.

- 20
4. Procedimiento de síntesis de radical libre ABTS^{•+} estable, según reivindicación 1, donde se usa un oxidante químico elegido entre dióxido de magnesio o persulfato potásico. Este catalizador se consume en su totalidad después de finalizar la síntesis y la disolución resultante se almacena protegida de la luz y bajo presión de un gas inerte.

- 25
5. Procedimiento de síntesis de radical libre ABTS^{•+}, según reivindicación 1 y mediante uso de catalizadores bioquímicos, donde el catalizador se selecciona entre enzimas como peroxidasa de rábano picante o la lacasa, o proteínas tipo mioglobina o hemoglobina. En todo caso esos biocatalizadores han de ser
- 30
extraídos para eliminarlos de la disolución resultante después de la síntesis.

- 35
6. Procedimiento de síntesis de radical libre ABTS^{•+} mediante uso de biocatalizadores, según reivindicación 3 y 5, donde los biocatalizadores se inmovilizan en la superficie de nanoesferas magnéticas y el conjunto es extraíble mediante fuerza de atracción magnética al finalizar la síntesis.

7. Procedimiento de síntesis de radical libre mediante biocatalizadores, según reivindicación 3 y 5, inmovilizados en la superficie de partículas metálicas extraíble mediante cualquier método.
- 5 8. Procedimiento de síntesis de radical libre ABTS^{•+} mediante biocatalizadores, según reivindicación 3 y 5, inmovilizados en la superficie de un biorreactor extraíble después de finalizar la reacción.
9. Procedimiento de síntesis de radical libre ABTS^{•+} mediante biocatalizadores, según
10 reivindicación 3 y 5, extraíble gracias a una simple centrifugación, diálisis, cromatografía o cualquier otro método.
10. Procedimiento de almacenamiento bajo presión de una disolución de radical libre ABTS^{•+} sintetizado según reivindicaciones 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 donde se usa un gas
15 inerte tipo nitrógeno, argón, helio o similares para almacenar la disolución resultante bajo presión y lejos del oxígeno.
11. Procedimiento de conservación de radical libre ABTS^{•+} sintetizado según reivindicaciones 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 y almacenado según 10 donde la disolución
20 resultante se protege de la luz.
12. Procedimiento de síntesis, conservación y almacenamiento del radical libre ABTS^{•+} según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-11 para la determinación de la capacidad antioxidante en muestras de interés.
25
13. KIT para la medida de la capacidad antioxidante a base de radical libre ABTS^{•+} sintetizado, conservado y almacenado según cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 11.
- 30 14. KIT de medida de la capacidad antioxidante compuesto de dos botes:



Dónde:

- 35 R es una disolución estable del radical libre ABTS^{•+} sintetizada y almacenada según reivindicaciones 1 a 11 y P es un patrón de calibración del método.

15. KIT de medida del contenido polifenólico o de cualquier antioxidante y de cualquiera muestra donde se usa el radical libre ABTS^{••} sintetizado, conservado y almacenado según cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 11.
- 5 16. KIT de medida de la concentración de cualquier antioxidante y/o sus derivados presente en una muestra de manera individual o en conjunto, donde se usa el radical libre ABTS^{••} sintetizada y almacenada según reivindicaciones 1 a 11.

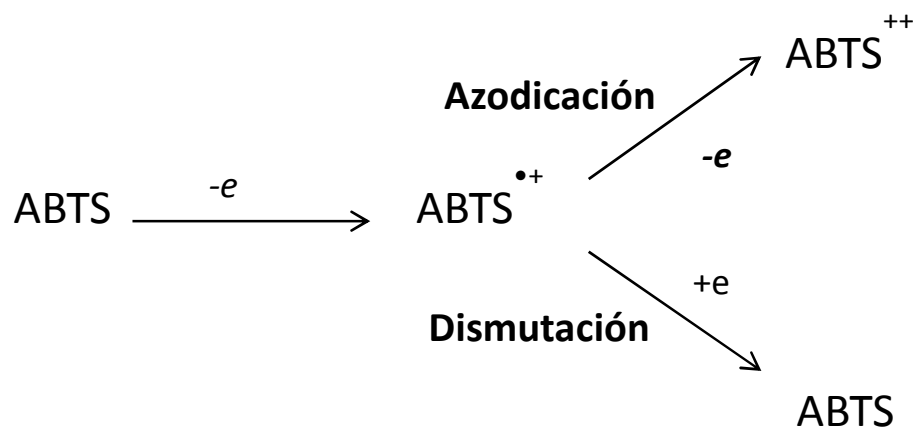


Figura 1

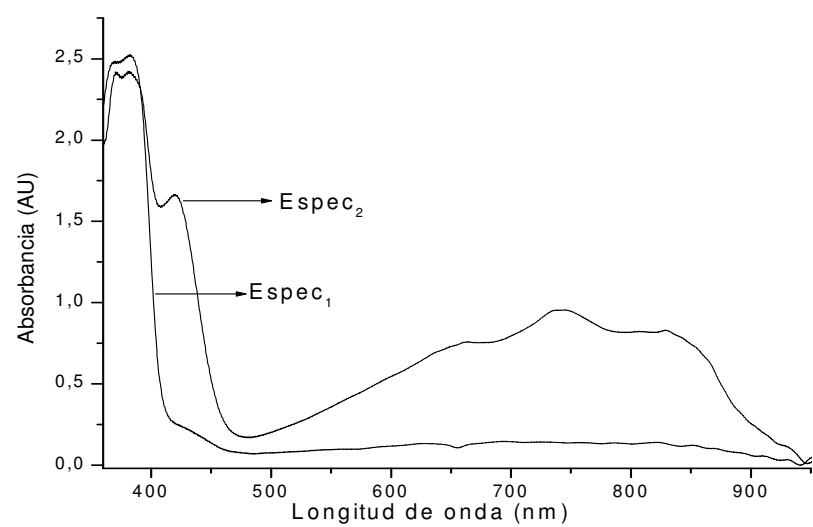


Figura 2

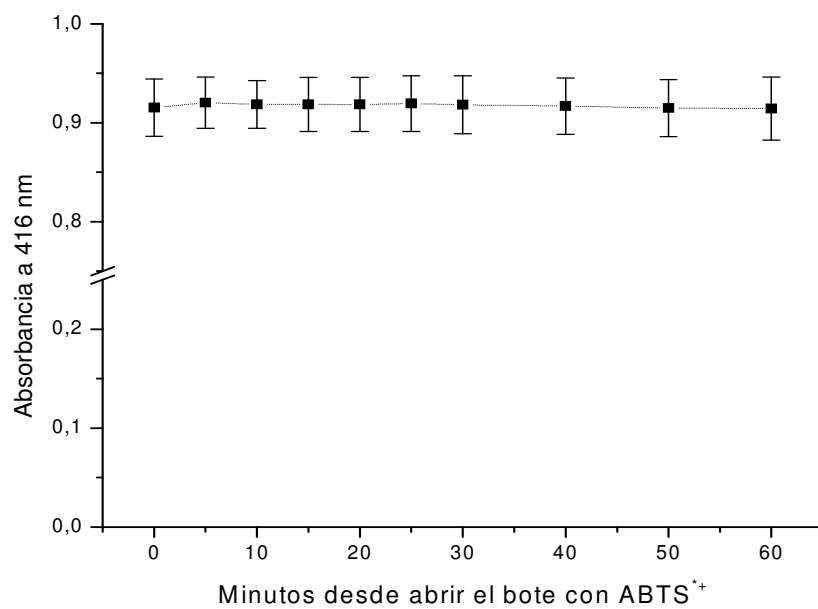


Figura 3

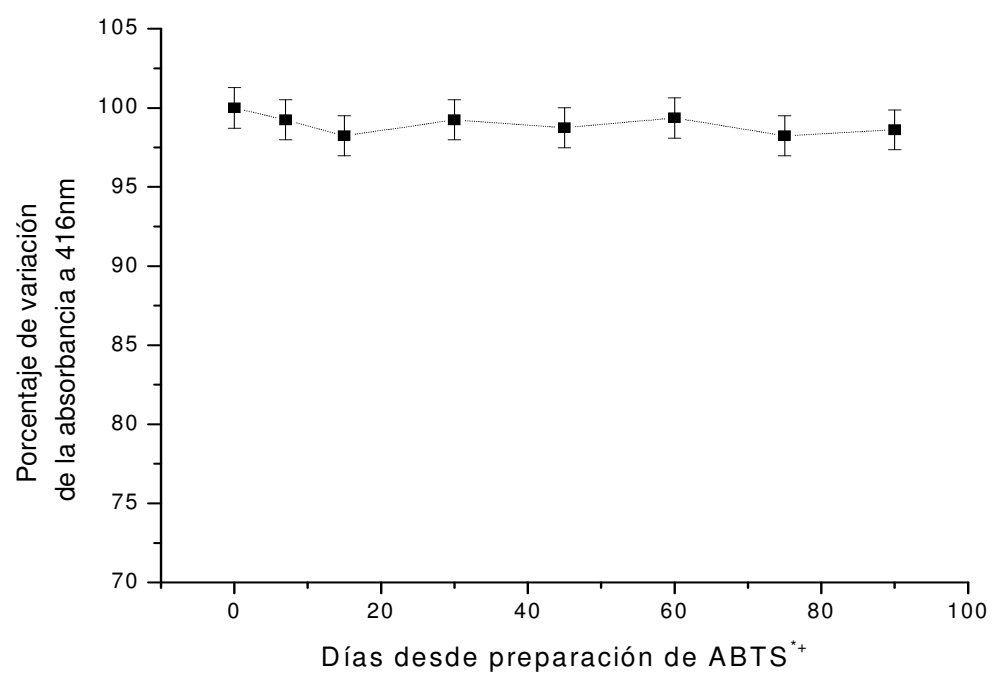


Figura 4

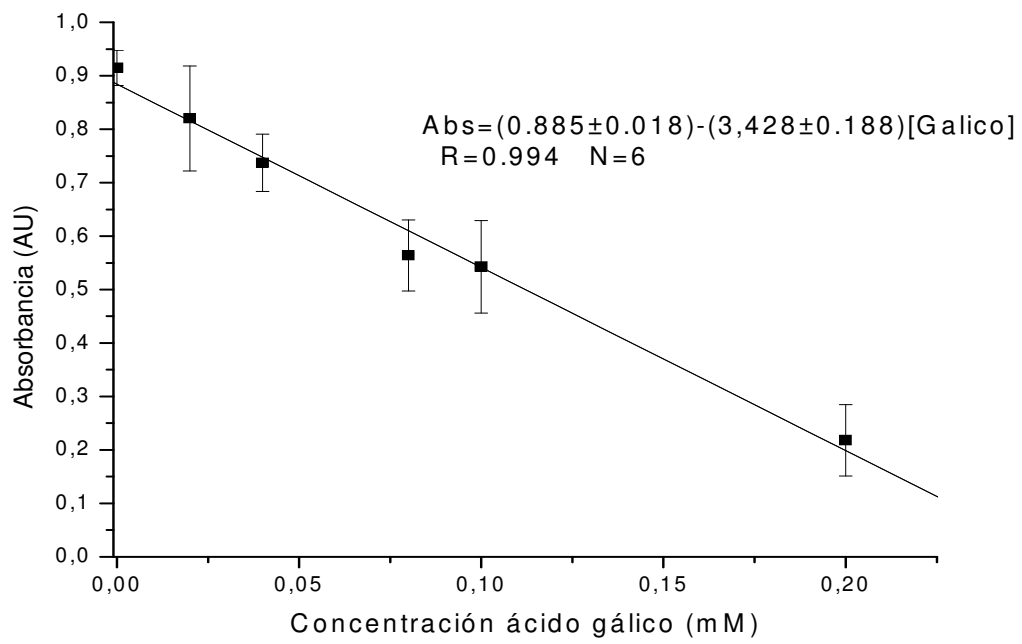


Figura 5

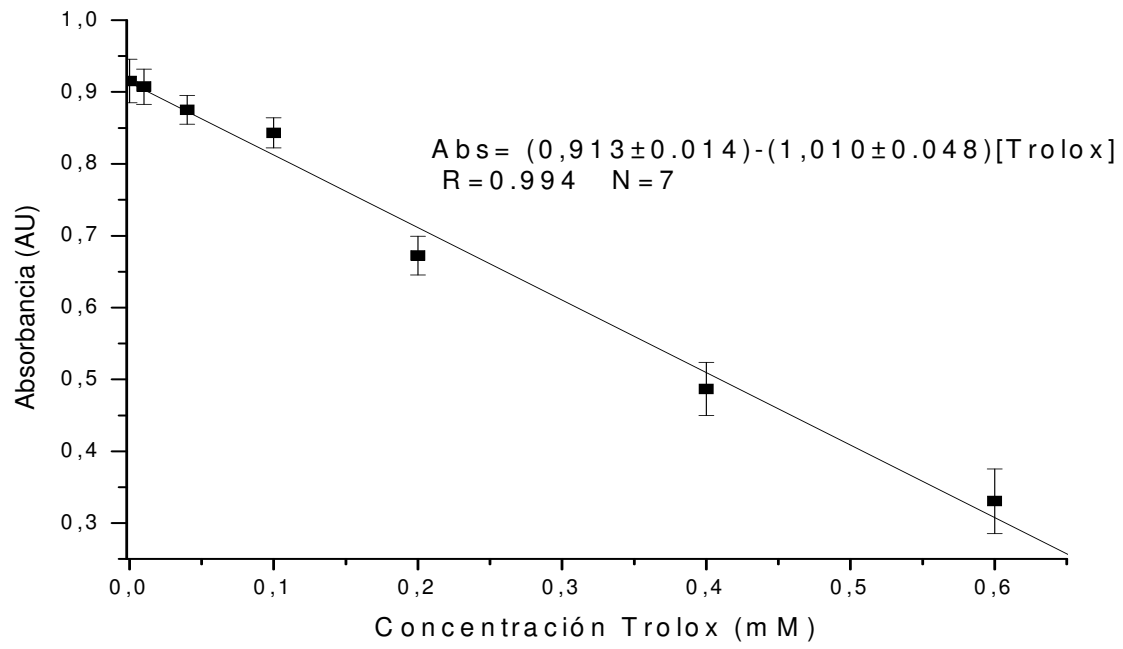


Figura 6

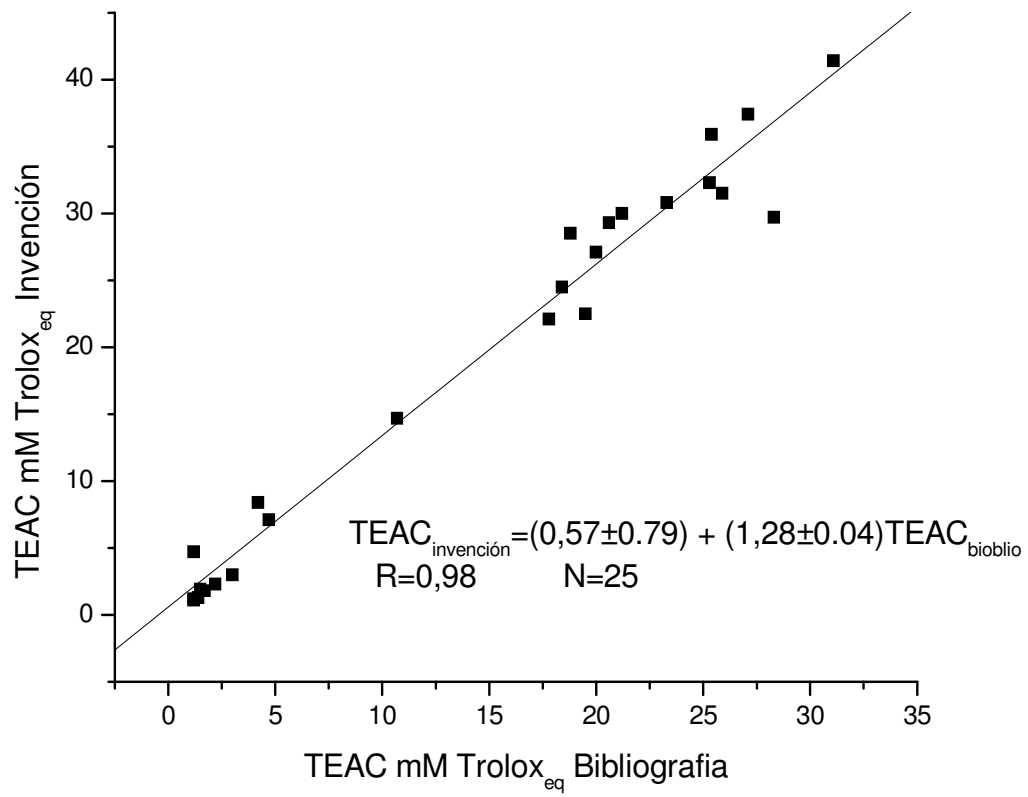


Figura 7

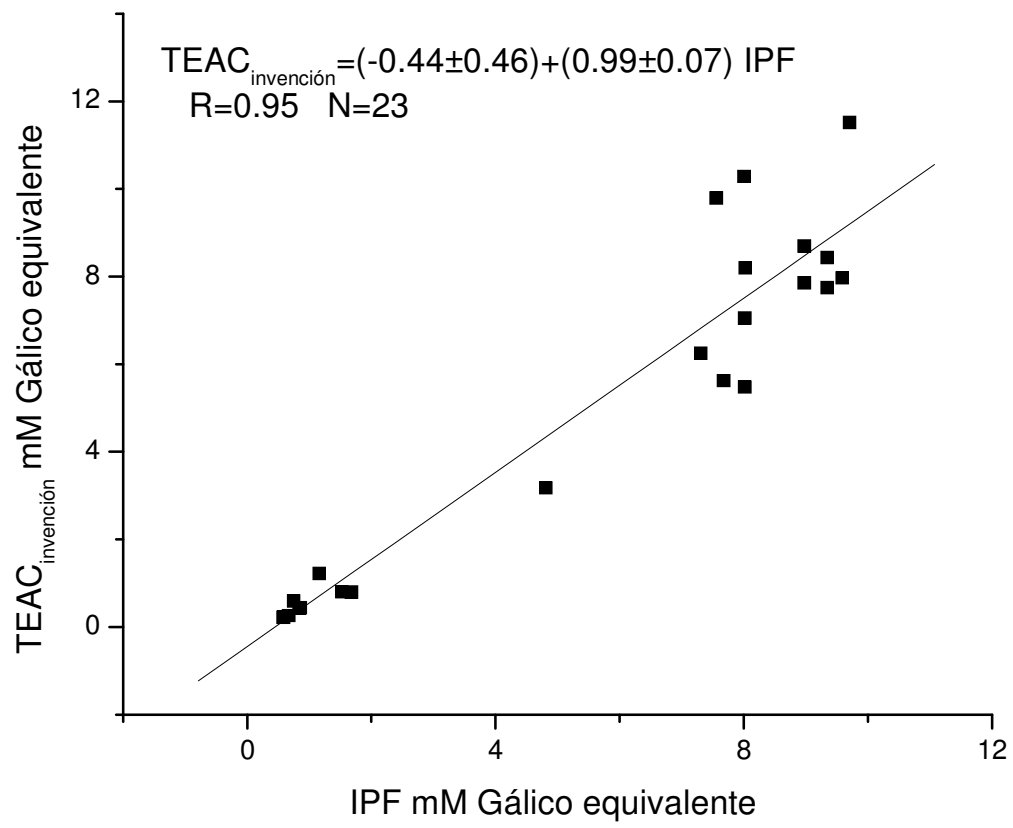


Figura 8



- ②① N.º solicitud: 201530688
②② Fecha de presentación de la solicitud: 18.05.2015
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/52** (2006.01)
C09B43/06 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	CN 102532273 A (LIANG X) 04/07/2012, (Resumen) World Patent Index [en línea]. Londres (Reino Unido) Thomson Publications, LTD. [Recuperado el 26/10/2016] DW 201260, N° de acceso 2012-K99768.	1,2,4,10-16
X	Magalhaes, L. M. et al. "Flow injection based methods for fast screening of antioxidant capacity". Talanta, 2009, páginas 1559-1566. Ver resumen; introducción; tabla 1; página 1562, columna 2, párrafo 3.	1-3, 5, 8-12
A	Zhu, Y. et al. "Immobilization of Trametes versicolor Laccase on Magnetically Separable Mesoporous Silica Spheres". Chemistry of Materials, 2007, Vol. 19, Páginas 6408-6413. Ver resumen; página 6411, columna 2, párrafo 2.	1-16
A	MX 2008011324 A (UNIV AUTONOMA METROPOLITANA) 04/03/2010, Reivindicaciones 1-4.	1-16

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
26.09.2016

Examinador
N. Martín Laso

Página
1/4

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

G01N, C09B

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, BD-TXT, NPL, BIOSIS, XPESP, CAS.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.09.2016

Declaración**Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 6,7

SI

Reivindicaciones 1-5, 8-16

NO**Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)**

Reivindicaciones 6,7

SI

Reivindicaciones 1-5, 8-16

NO

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	CN 102532273 A (LIANG X)	04.07.2012
D02	Magalhaes, L. M. et al. "Flow injection based methods for fast screening of antioxidant capacity". Talanta, 2009, páginas 1559-1566.	31.10.08
D03	Zhu, Y. et al. "Immobilization of Trametes versicolor Laccase on Magnetically Separable Mesoporous Silica Spheres". Chemistry of Materials, 2007, Vol. 19, Páginas 6408-6413.	2007

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 solicitud se refiere a un procedimiento de síntesis y almacenamiento de radical libre ABTS⁺ para la determinación de la capacidad antioxidante de muestras de interés y a un kit donde se incorpora una disolución estable del radical ABTS⁺ obtenido por el procedimiento anterior.

El documento D01 divulga un método para detectar la capacidad antioxidante de muestras de péptidos que incluye la preparación de una solución del radical ABTS⁺ (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) mediante disolución en agua de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (2,8 mM) como oxidante. Dicha solución se utiliza para la evaluación de la capacidad antioxidante de distintas muestras (resumen).

La invención definida en las reivindicaciones independientes 1, 2, 4 y 10-16 deriva directamente y de forma inequívoca de lo divulgado en el documento D01, careciendo por tanto de novedad (Art. 6.1 LP 11/1986).

El documento D02 divulga un método enzimático para la determinación de la capacidad antioxidante de muestras fisiológicas o muestras procedentes de alimentos o fármacos utilizando soluciones del radical ABTS⁺. Dicho radical se prepara mediante tratamiento de una solución de ABTS/H₂O₂ con la enzima peroxidasa del rábano picante inmovilizada en un bioreactor (resumen; introducción; tabla 1; página 1562, columna 2, párrafo 3).

A la vista de dicho documento D02, la invención definida en las reivindicaciones 1-3, 5, 8-12 de la solicitud carece de novedad (Art. 6.1 LP 11/1986).

En relación a las reivindicaciones dependientes 6 y 7, la diferencia entre la invención definida en dichas reivindicaciones y lo divulgado en los anteriores documentos reside en que el procedimiento de síntesis del radical ABTS⁺ se lleva a cabo utilizando biocatalizadores inmovilizados en la superficie de nanoesferas magnéticas ó partículas metálicas que son extraídos mediante medios magnéticos en cuanto termina el proceso de oxidación de ABTS al radical ABTS⁺.

Aunque es conocido en el estado de la técnica que enzimas lacasa inmovilizadas sobre esferas de silicio magnéticas pueden llevar a cabo la oxidación de ABTS (ver documento D03: resumen; página 6411, columna 2, párrafo 2), no se divulgan estudios sobre la estabilidad de las soluciones del radical ABTS⁺ obtenidas ni su utilización para la determinación de la capacidad antioxidante de muestras de interés. Por lo tanto, se considera que no sería evidente para un experto en la materia desarrollar un procedimiento de síntesis del radical ABTS⁺ que se lleve a cabo utilizando biocatalizadores inmovilizados en la superficie de nanoesferas magnéticas ó partículas metálicas, en el que dichos biocatalizadores sean extraídos en cuanto termine el proceso de oxidación del ABTS al radical, obteniéndose soluciones del radical ABTS⁺ de estabilidad notablemente mejorada que pueden ser usados en la determinación de la capacidad antioxidante de muestras de interés sin problemas de interferencia o sobreoxidación, así como ser incorporadas en kits comerciales al ser susceptibles de ser almacenadas.

En consecuencia, la invención definida en las reivindicaciones 6 y 7 es nueva y posee actividad inventiva (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986).