(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 597 956**

(51) Int. CI.:

G01N 33/84 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.02.2011 PCT/EP2011/052669**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **01.09.2011 WO11104267**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.02.2011 E 11714235 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016 EP 2539716**

(54) Título: **Método para determinar el poder antioxidante de fluidos biológicos y vegetales**

(30) Prioridad:

25.02.2010 EP 10425050

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.01.2017

(73) Titular/es:

COR.CON. INTERNATIONAL S.R.L. (100.0%)
Strada Langhirano, 264/1A
43124 Parma, IT

(72) Inventor/es:

CORNELLI, UMBERTO

(74) Agente/Representante:

RUO , Alessandro

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para determinar el poder antioxidante de fluidos biológicos y vegetales

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a un método para determinar el poder antioxidante de fluidos biológicos, tales como la saliva, el suero, el plasma, la orina, el sudor, las lágrimas y los fluidos de plantas tales como frutas y verduras, y bebidas derivadas de las mismas. Dicho método ha demostrado ser particularmente adecuado cuando se evalúa el poder antioxidante de la saliva, que presenta complejidades particulares desde el punto de vista analítico.

[0002] La presente invención también se refiere a un kit para la aplicación de dicho método.

Estado de la técnica

[0003] La saliva es el primer fluido biológico en estar en contacto con el ambiente externo, cuando se consumen alimentos, bebidas o sustancias volátiles. Su apariencia es la de un fluido de tipo mucoseroso claro ligeramente ácido, que se forma por las secreciones de las glándulas mayores (parótidas, submandibulares y sublinguales) combinado con fluido del surco gingival.

[0004] La cantidad de la saliva producida durante un período de 24 horas varía de 1 a 1,5 litros. El flujo de saliva durante el sueño es esencialmente despreciable, y durante las horas de vigilia en reposo es, de media, 0,3 ml/min, mientras que bajo estimulación que puede alcanzar hasta 7 ml/min.

[0005] El flujo de saliva está sometido a muchas variaciones y, de hecho, no solo se observan ritmos circadianos, sino que también se observan ritmos estacionales, siendo menor en verano y más alto en invierno. El flujo también varía de acuerdo con el estado de hidratación, la edad, el sexo (las mujeres tienen tanto secreciones basales como secreciones estimuladas más bajas que los hombres [1]), la intensidad de la luz (hay una reducción del 30-40 % en oscuridad [2]) y ciertos hábitos como el tabaquismo, lo que aumenta la secreción de acuerdo con la irritación local [2], y el uso de chicles.

[0006] La contribución a la secreción total por las diversas glándulas salivales en reposo (por tanto, no estimulada por alimentos y/o la masticación) es el 20 % parótida, el 65 % submandibular y el 7-8 % sublingual.

[0007] Sin embargo, durante la estimulación, la secreción predominante es claramente parótida y contribuye con aproximadamente el 50 % de la secreción.

[0008] En general, el pH de la saliva varía de 6 a 7, sin embargo, bajo condiciones de flujo disminuido, el pH se reduce a 5,3, mientras que con un aumento del flujo se eleva a 7,8 [1]. Como regla general, la saliva parótida tiene un mayor contenido de amilasa, proteínas ricas en prolina y aglutinina, con pequeñas cantidades de lisozima y glicoproteínas. Las glándulas sublingual y submandibular en cambio producen mucinas (MG1 y MG2) y lisozima en particular.

[0009] La saliva tiene principalmente cinco funciones principales, en concreto: lubricación y protección, zonas de separación y limpieza, mantenimiento de la integridad del diente, acción antibacteriana y, finalmente, identificación de sabores y la digestión. Obviamente, todas estas funciones no pueden considerarse por separado sino que forman parte de un sistema integrado [3], es decir, la saliva en sí, con una de estas funciones que realiza su acción antioxidante. Esta última función depende tanto del flujo de saliva como de los tipos de ciertos componentes de la saliva.

[0010] Con respecto a los diferentes tipos de secreciones, la contribución más considerable a los antioxidantes solubles en agua la realiza la parótida, mientras que otros, tales como los antioxidantes lipófilos son en su mayoría de origen submandibular y sublingual. En conjunto, los antioxidantes más secretados son de naturaleza hidrófila, mientras que otros tipos contribuyen menos del 10 % de la capacidad antioxidante total [5].

[0011] En términos de antioxidantes, por tanto, la secreción salival comprende varios compuestos y enzimas, el más importante de los cuales son el ácido úrico (AU) y las peroxidasas (POXs), siendo ambos solubles en agua.

[0012] El AU representa aproximadamente el 70 % de la capacidad antioxidante de la saliva, mientras que el otro antioxidante soluble en agua contenido en la misma, es decir, el ácido ascórbico, parece ser de importancia secundaria o auxiliar en comparación con el AU [5]. Sin embargo, las concentraciones de ácido ascórbico en el fluido crevicular parecen llegar a ser 3 veces mayores que en plasma [6]. Existe una correlación entre el plasma y el AU salival, con la fuente de plasma que prevalece.

[0013] Con respecto a las enzimas, las más importantes son las POXs. Sin embargo, también se han aislado otras enzimas tales como la glutatión peroxidasa (glu POx) y la superóxido dismutasa (SOD) [7]. Estas últimas son enzimas que respaldan la producción, el consumo y la regeneración de glutatión reducido (GSH), que se encuentra entre los sistemas antioxidantes más importantes del cuerpo; opera en todas las células que están presentes en prácticamente todos los líquidos y por tanto también en la saliva, aunque en cantidades limitadas.

[0014] En términos de peso, las POXs representan solo el 0,01 % del total de las proteínas salivales, habiendo esencialmente dos: la peroxidasa salivar real (POX) y la mieloperoxidasa. Esta última es similar a la lactoperoxidasa producida por los linfocitos en las regiones inflamadas de la cavidad oral [8, 9]. Las POXs tienen un doble papel:

a) control de los niveles de H_2O_2 producidos por las bacterias y leucocitos;
b) acción antibacteriana específica para ciertas bacterias.

El H_2O_2 es un potente oxidante (con la capacidad de atravesar cualquier membrana de la célula) y es tóxico tanto a nivel local como en el sistema gastrointestinal. De hecho, es capaz de oxidar el ion tiocianato (SCN^-, es decir, el producto de la detoxificación de cianuro [CN^-] secretado por las glándulas salivales) de acuerdo con la siguiente reacción:

$$SCN^- + H_2O_2 \rightarrow HOSCN + H_2O$$

Ácido hipotiocianoso

[0015] El HOSCN y su conjugado $OSCN^-$ tienen una capacidad citotóxica considerable [9] en el sentido de que son potentes oxidantes con acción antibacteriana [10]; inhiben la glicólisis bacteriana mediante la oxidación de sus grupos sulfhidrilo.

[0016] En conjunto, la combinación de POX, lactoperoxidasa y H_2O_2, y SCN^- es más potente que el H_2O_2 solo [9], ya que puede funcionar dentro de un intervalo de pH más amplio.

[0017] De hecho, en un entorno ácido la forma HOSCN protonada es más activa (volviéndose cada vez más lipófila), mientras que el H_2O_2 es más activo a pH neutro [10]. No se debe pasar por alto el hecho de que en la reacción entre el H_2O_2 y el $OSCN^-$, también se produce en parte ΣO_2 (singlete de oxígeno), que también tiene un poder oxidante considerable [11].

[0018] Otra reacción que implica el H_2O_2 es con cloro para formar HClO (ácido hipocloroso); esta reacción se lleva a cabo en los neutrófilos por la acción de las mieloperoxidasas y es uno de los mecanismos bactericidas que pueden actuar contra la flora bacteriana.

[0019] Sin embargo, los procesos oxidativos pueden ser protectores o perjudiciales, y por tanto se han de ser controlar con el fin de explotar mejor su potencial de protección.

[0020] De lo descrito anteriormente, se deduce que el poder antioxidante de la saliva procede de varios componentes complejos que son difíciles de evaluar. Sin embargo, un análisis exhaustivo de su actividad combinada es un indicador importante en la determinación de la capacidad de defensa salival.

[0021] La Tabla 1 muestra algunos de los parámetros salivales reseñables en condiciones en reposo y estimuladas [7], para ser relacionados con la protección antioxidante.

Tabla 1. Flujo salival y valores de algunas variables salivales relacionadas con el poder antioxidante en reposo y después de la estimulación (valores medios ± DE)

Variable	Unidad de medida	Toda la saliva	
Flujo en reposo ml/min	ml/min	0,42 ± 0,07	
Flujo después de la estimulación		0,92[a] ± 0,11	
		[C]	[T] *
POX en reposo mU/ml	mU/ml	284[a]	120
POX después de la estimulación		175	161
SOD en reposo U/ml	U/ml	0,79	0,33
SOD después de la estimulación		0,82	0,74
Ácido úrico (AU) en reposo	mg/dl	2,87[a]	1,20
Ácido úrico (AU) después de la estimulación		1,15	1,06

Variable	Unidad de medida	Toda la saliva	
TAS en reposo	mM	0,68ª	0,28
TAS después de la estimulación		0,42	0,38
Grupos tiol en reposo	µM	26,6ª	11
Grupos tiol después de la estimulación		19,1	18
* [C] concentraciones; [T] cantidad total derivada del producto del flujo de saliva y concentración; no se muestran las desviaciones típicas de C, pero están disponibles en [7], ª ANOVA p <0,05 en reposo Vs después de la estimulación. TAS = estado antioxidante total.			

[0022] Los valores se refieren a 19 sujetos aparentemente sanos [7] entre 18 y 54 años. La saliva se recogió usando una taza Carlson-Crittenden para la saliva parótida, mientras que para las salivas sublingual y submaxilar se utilizó una succión suave.

[0023] La estimulación se consigue con una solución de ácido cítrico al 2 % aplicada en gotas (1 ml) en el dorso de la lengua, a intervalos de 30 segundos. La recogida se realizó en unos pocos minutos usando ambos métodos, pero no se especificó el período de tiempo preciso.

[0024] Cabe señalar que la condición de equilibrio oxidativo se expresó como SOD (enzima superóxido dismutasa), POX (peroxidasa), AU, TAS (estado antioxidante total) y también, por último, por el complejo de grupo tiol (es decir, grupos de aminoácido/péptido/proteínas de azufre con capacidad de reducción).

[0025] También cabe destacar el valor [T] en el lado derecho de la columna, es decir, el producto del flujo y la concentración. Este valor no fue proporcionado por los autores, sino que procede de la transformación de los datos de forma adecuada para permitir así un examen más completo de lo que está ocurriendo.

[0026] A partir de esta evaluación de T, se deduce que, aunque las concentraciones tienden a disminuir durante la estimulación (excepto para la SOD), las cantidades totales de todos los componentes tienden a aumentar (POX en un 34 %, SOD en un 124 %, TAS en un 36 %, grupos tiol en un 50 %), excepto para el AU que en cambio tiende de disminuir.

[0027] Por tanto, pareciera que el antioxidante predominante en la saliva no se puede expresar como concentración, sino que se debe expresar como cantidad total. Por otra parte, el poder antioxidante total, expresado como TAS también debería expresarse como capacidad total y no como concentración, a fin de lograr una medición más precisa.

[0028] En otro estudio [5], sobre 28 sujetos aparentemente sanos de edades comprendidas entre los 25 y los 50 años, que se muestra en la tabla 2, se determinó el poder antioxidante de la saliva mediante la evaluación del TAS (estado antioxidante total o capacidad TAC o actividad TAA). En este experimento se recogió saliva de una manera diferente a la del experimento anterior, y durante un período de 15 minutos. Para la recogida en reposo, los sujetos simplemente escupieron en un recipiente mientras que se llevaba a cabo la recogida en condiciones estimuladas por masticación de 1 g de parafina y a continuación haciendo que los sujetos escupieran en recipientes adecuados cada 2 minutos durante 15 minutos.

Tabla 2. Flujo salival y valores de algunas variables salivales relacionadas con el poder antioxidante en reposo y después de la estimulación (valores medios ± DE)

Variable	Unidad de medida	Valores	Total [T] *
Flujo en reposo	ml/min	0,33 ± 0,17	
Flujo después de la estimulación		1,93 ± 1,07	
TAS en reposo	mM	0,25 ± 0,06	0,08
TAS después de la estimulación		0,14 ± 0,04	0,28
Ácido úrico en reposo	mg/dl	3,68 ± 0,64	1,21
Ácido úrico después de la estimulación		1,75 ± 0, 36	3,40
Albúmina en reposo	µM	12 ± 7	4,10
Albúmina después de la estimulación		8 ± 2	15,40

Variable	Unidad de medida	Valores	Total [T] *
Ascorbato en reposo	µM	9 ± 6	3,00
Ascorbato después de la estimulación		9 ± 4	17,00
* [T] el producto de concentración y flujo			

[0029] Como en el caso de la Tabla 1, el producto de los cálculos de flujo y concentración [T] se dan en unidades comparables con las de los valores en la Tabla 1. Como en el estudio anterior, se puede observar que la estimulación reduce las concentraciones pero aumenta las cantidades totales.

[0030] El otro elemento importante que se plantea está representado por las diferencias en el flujo (tanto el flujo de reposo como el flujo estimulado) que se comportan como "amplificadores" negativos o positivos de las cantidades totales.

[0031] A este respecto, una reducción de flujo de 0,42 ml/min (Tabla 1) a 0,33 ml/min (Tabla 2) [que corresponden a una reducción de aproximadamente el 20 %] da como resultado una modificación de la cantidad total de TAS de 0,28 mM (Tabla 1) a 0,08 mM (Tabla 2) que corresponden a una reducción de aproximadamente el 70 % de TAS. Las diferencias se amplifican aún más en proporción a la estimulación del flujo; a medida que el flujo se incrementa 2 veces, el TAS total aumenta 8 veces.

[0032] De los ejemplos mostrados se deduce que la estimación de los TAS reales se debe llevar a cabo sobre los flujos normalizados, posiblemente limitados para evitar amplificaciones excesivas.

[0033] En el mismo experimento, véase Tabla 3 a continuación, se consideraron algunos casos de paradontosis para los que no se describieron los criterios esenciales de la enfermedad (casos con un grado de paradontosis de leve a moderado, con una mala higiene bucal).

Tabla 3. Flujo salival y valores de algunas variables salivales relacionadas con el poder antioxidante en reposo y después de la estimulación (valores medios ± DE))

Sujetos con paradontosis (valores medios ± DE) en 7 casos (4 M, 3 H con edades comprendidas entre los 25 y los 45 años			
Variables	Unidad de medida	Valores	Total [T]
Flujo en reposo	ml/min	0,34 ± 0,17	
Flujo después de la estimulación		1,33 ± 0,58	
TAS en reposo	mM	0,30 ± 0,01	0,10
TAS después de la estimulación		0,17 ± 0,07	0,23
Ácido úrico en reposo	mg/dl	4,27 ± 0,89	1,45
Ácido úrico después de la estimulación		2,20 ± 0,06	2,90
Albúmina en reposo	µM	11,7 ± 7,0	4,00
Albúmina después de la estimulación		9,3 ± 2,8	12,40
Ascorbato en reposo	µM	6,4 ± 3,6	2,10
Ascorbato después de la estimulación		6,6 ± 2,9	8,80

[0034] Los autores concluyen que:

a) la saliva de los sujetos afectados por paradontosis tiene un poder antioxidante idéntico a la de los sujetos normales;
b) el AU se correlaciona bien con el poder antioxidante de la saliva.

[0035] En realidad, teniendo en cuenta los valores de T y comparando los valores con los de la Tabla 1, se puede observar que:

i) la estimulación salivar en sujetos normales aumenta el TAS 3,5 veces, mientras que en sujetos con paradontosis el aumento es de 2,5 veces (70 % menor);
ii) la estimulación salivar en sujetos normales aumenta el AU 2,8 veces, mientras que aumenta solo 2,0 veces en los casos de la enfermedad (70 % menos); lo mismo puede decirse del ascorbato (inferior en un 70 %); para la albúmina, las diferencias son un 20 % inferiores.

[0036] En otras palabras, en estas condiciones experimentales se ha demostrado exactamente lo contrario, es decir, que se reducen las defensas antioxidantes de los sujetos afectados por paradontosis, un hecho que se ha sido

demostrado recientemente de forma generalizada [12].

[0037] La evaluación sistemática del poder antioxidante de la saliva se remonta a finales de la década de 1990, recurriendo en realidad al uso de los mismos métodos que se utilizan para el suero o plasma [13, 14, 15].

[0038] En su mayor parte, estos métodos se centraron en la investigación de los componentes individuales, tales como POXs, AU, GSH, vitaminas, o la investigación de aductos oxidativos, como los isoprostanos, TBARS (sustancias reactivas tiobarbitúricas), MDA (malonildialdehido) e hidroperóxidos.

[0039] Los métodos conocidos que en cambio evalúan la capacidad antioxidante en su totalidad son de tres tipos diferentes: espectrofotometría, quimioluminiscencia y voltametría.

[0040] Los métodos espectrofotométricos son idénticos a los utilizados para la determinación en sangre y explotan el principio de la reactividad de sustancias de tipo radicalario.

[0041] Estas sustancias son extremadamente reactivas y tienden a unirse inmediatamente a un aceptor que las captura, y a continuación cambia de color después de su captura. Los antioxidantes (que tienen poder reductor) contenidos en el fluido a evaluar tenderán a ceder sus electrones a las sustancias de tipo radicalario, que se añadieron a propósito a la muestra en cantidades conocidas; el aceptor entonces será incapaz de capturarlos. De esta manera se reducirá el grado de coloración.

[0042] El aceptor [5] habitual es 2,2'azinobis (3-etilbenzotiazolina 6 sulfonato) es decir, ABTS, que al capturar el radical se transforma en el ion radicalario $ABTS^+$ volviéndose de color azul-verde. Las lecturas se hicieron en la región UV, pero también a 660 nm, 734 nm, y 820 nm. Normalmente, se utiliza metahemoglobina como producto oxidable, y se utiliza H_2O_2 como producto oxidante.

[0043] La combinación de los dos productos en el fluido genera una reacción de Fenton y el radical que se forma **(OH*)** es capturado por el ABTS que se transforma en $ABTS^+$.

[0044] Por lo general, con este tipo de reacción, se hace referencia a una solución convencional con un poder antioxidante conocido. El sistema más utilizado es el que se refiere a Trolox, es decir, un análogo soluble de la vitamina E.

[0045] Por tanto, el potencial antioxidante se expresa como TEAC (es decir, capacidad antioxidante equivalente de Trolox); los valores que resultan de este método se denominan, según los autores, TAC (capacidad antioxidante total), o TAA (actividad antioxidante total) o TAS (estado antioxidante total). Las variables reactivas, parcialmente modificadas para mejorar el método, son tales que los valores obtenidos con el mismo método a menudo son muy diferentes incluso en el caso de los controles.

[0046] Por tanto, las comparaciones solo son válidas para experimentos llevados a cabo en las mismas condiciones experimentales, es decir, los datos procedentes de diferentes laboratorios son poco comparables.

[0047] El segundo método se basa en la quimioluminiscencia [13, 15].

[0048] La HRP (peroxidasa de rábano picante) cataliza la oxidación del luminol con H_2O_2. La luz producida por la reacción se amplifica en presencia de p-yodofenol en una reacción que se intensifica la señal luminosa.

[0049] Esta señal se puede reducir por la presencia de antioxidantes en el fluido y la reducción se mantiene hasta que los antioxidantes se agotan. La capacidad antioxidante se parametriza con una curva convencional utilizando un antioxidante conocido.

[0050] Un método adicional, basado en el mismo principio explota la capacidad de los antioxidantes presentes en el fluido para inhibir la luminiscencia generada por el contacto entre hidroperóxidos (que son los productos oxidados y por tanto los indicadores indirectos de la oxidación) con isoluminol/mieloperoxidasa [14].

[0051] La reacción de Fenton también puede desencadenar un estímulo quimioluminiscente, debido a la formación de un radical OH* que se puede reducir si hay presentes antioxidantes, en función del fluido en el que se activa la reacción [16]. Sin embargo, este método demostró ser poco reproducible, en el sentido de que los diferentes laboratorios dieron resultados diferentes que no eran muy comparables, incluso en individuos sanos [13, 15].

[0052] El tercer tipo se basa en la voltametría cíclica [17], que es sensible a la presencia de antioxidantes de bajo peso molecular en la saliva. La muestra a evaluar se coloca en una cubeta que contiene tres electrodos; el electrodo de apoyo (de carbono), el electrodo de referencia (Ag/AgCl) y el electrodo auxiliar (Pt). La aplicación de un potencial constante al electrodo de referencia permite registrar un potencial (voltamograma cíclico) cuyo valor es una función de la capacidad de los antioxidantes contenidos en el fluido para donar electrones.

[0053] Sin embargo, no todos los antioxidantes son capaces de donar electrones en una cantidad detectable por el electrodo de referencia; por tanto, la medición es solo una medida parcial tal que a veces se debe recurrir a electrodos específicos para ciertos antioxidantes (de tipo GSH).

[0054] También se conoce el ensayo de FRAP (Poder reductor/antioxidante férrico), establecido por primera vez por Benzie y Strain (1999) para medir el poder reductor del plasma, adaptado después para analizar la capacidad antioxidante de especies botánicas. El ensayo mide la reducción de 2,4,6-tripiridil-S-triazina férrica (TPTZ) para formar un producto azul intenso (Guo et al., 2003; Jiménez-Escrig et al, 2001). El poder reductor se relaciona con el grado de hidroxilación y el nivel de conjugación en los polifenoles (Pulido et al., 2000). Sin embargo, el ensayo de FRAP es incapaz de detectar compuestos que actúan por transferencia de hidrógeno (extinción de radicales), tales como tioles y proteínas. Esto da lugar a una subestimación de los resultados, sobre todo en el suero.

[0055] Por otra parte, el pH fuertemente ácido, que se utiliza en el ensayo de FRAP para mantener el hierro en solución, da lugar a un cambio en el mecanismo de reacción dominante con la consiguiente implicación de que los resultados del ensayo de FRAP no son comparables con otras mediciones de los ensayos de antioxidantes. El FRAP se basa en la premisa de que las reacciones redox tienen lugar con bastante rapidez (en 4 a 6 minutos), pero en realidad esto no sucede en cualquier momento. Esto hace que este ensayo dependa en gran medida del tiempo necesario para el análisis.

[0056] También es conocido el ensayo de BAP (potencial antioxidante biológico) que evalúa el poder antioxidante de suero plasmático en términos de la capacidad de este último para reducir los iones férricos a iones ferrosos, y detecta los cambios de color de un cromógeno adecuado por medio de fotometría.

[0057] En el ensayo de BAP, por tanto, la muestra de suero a analizar se disuelve en una solución de color obtenida mediante la adición de una fuente de iones férricos ($FeCl_3$, es decir, cloruro férrico) a un cromógeno específico (un compuesto a base de azufre). Después de una breve incubación (5 minutos), la solución se decolora; esta decoloración será más pronunciada cuantos más componentes del suero analizado hayan sido capaces de reducir los iones férricos presentes inicialmente y responsables de la formación del complejo de color en el intervalo de tiempo considerado. Mediante la evaluación fotométrica del grado de esta decoloración, es posible medir la cantidad de iones férricos reducidos y, en resumen, la capacidad reductora o el poder antioxidante del suero analizado con respecto a un suero de referencia, conocido como calibrador. Los resultados del ensayo, es decir, el poder antioxidante "fisiológico" de reducción de hierro del suero, se expresan en miliequivalentes de antioxidantes que reducen el hierro férrico por litro de muestra, de acuerdo con la fórmula:

$$\frac{\text{[Abs del reactivo blanco - Abs de la muestra]}}{\text{[Abs del reactivo blanco - Abs del calibrador])}} \times \text{calibrador}$$

en la que:

- [Abs] son los valores de absorbancia de la solución medida a 505 nm; y
- [Calibrador] es la concentración del calibrador expresado en mEq/l.

[0058] Teniendo en cuenta que 1 ml de suero se considera suficiente para reducir al menos 1,8 mol/l de vitamina C, los resultados del ensayo de BAP se comparan entonces con la siguiente tabla de referencia:

Valores de referencia expresados como nmol/l de sustancias antioxidantes como la vitamina C	
> 2200	Valor óptimo
2200-1800	Valor limítrofe
2000-1800	Estado de deficiencia moderada
1800-1600	Estado de deficiencia
1600-1400	Estado de deficiencia severa
<1400	Estado de deficiencia muy severo

[0059] El ensayo de BAP se ha declarado que es lineal entre 1000 y 3000 µmol/l.

[0060] Sin embargo, se ha observado que este ensayo, además de depender del uso de dicho calibrador de procedencia y tipo desconocidos, no tiene en cuenta la complejidad de la composición de las muestras a analizar, en particular en el caso de fluidos biológicos, en los que hay presentes compuestos, que interfieren con la reducción de iones férricos, alterando y falsificando de este modo la determinación del poder antioxidante resultante con respecto a su valor real, y por tanto, da lugar a una evaluación incorrecta del estado antioxidante real de la muestra.

[0061] Métodos similares se describen en Shanmugasundaram P. et al. ("Hepatoprotective and antioxidant effects of Hygrophila auriculata (K. Schum) Heine Acanthaceae root extract", Journal of Ethnopharmacology, Elsevier

Scientific Publishers LTD, vol. 104, no. 1-2, 8 de marzo de 2006, páginas 124-128) en el que se utilizan tiocianato férrico (FTC) y ácido tiobarbitúrico (TBA) con el fin de determinar el poder antioxidante de un fluido.

[0062] HU M. Z.-C. et al. ("Sol-gel and ultrafine particle formation via dielectric tuning of inorganic salt-alcohol-water solutions", Journal of Colloid and Interface Science, vol. 222, núm. 1, 1 de Febrero de 2000, páginas 20-36) describen un proceso para la formación de sol-gel y partículas de óxido de circonio ultrafinas. Con referencia al resumen y a la Figura 1, la solución de partida implica las siguientes soluciones madre:

- solución madre A: solución acuosa de cloruro de zirconilo ($ZrOCl_2$),
- solución madre B: solución acuosa de HPC (hidroxipropilcelulosa),
- solución madre C: agua desionizada destilada dos veces, y
- solución madre D: alcoholes u otros disolventes orgánicos.

[0063] Por tanto, en esta referencia, el disolvente puede ser cualquier disolvente orgánico y también hay presente hidroxipropil celulosa.

[0064] Young Tae Moon et al. ("Preparation of monodisperse and spheric zirconia powders by heating of alcohol-aqueous salt solutions", Journal of the American Ceramic Society American Ceramic Soc USA, vol. 78, no. 10, octubre de 1995, páginas 2690-2694) describen un proceso para la preparación de polvos de óxido de circonio monodispersos y esféricos. Con referencia al resumen y a la Figura 1, la solución de partida consiste en una mezcla de alcohol-agua, cloruro de zirconilo octahidrato y HPC (hidroxipropilcelulosa). Por tanto, el "alcohol" no se limita a ninguna medida específica y también hay presente hidroxipropil celulosa.

[0065] El resumen de Wu Z.-G. et al. ("Preparation and characterization of ZrO2 aerogel", XP002588430, n.º de acceso a la base de datos E2004368345244) se refiere a un proceso para la fabricación de aerogel ZrO2 a partir de cloruro de zirconilo dihidratado. En este resumen, el "alcohol" no se limita a ninguna medida específica y la presencia de otros componentes no está excluida.

[0066] Neagu R. et al. ("Initial stages in zirconia coatings using ESD", Chemistry of Materials American Chem Soc USA, vol. 17, no. 4, 22 de Febrero de 2005, páginas 902-910) desvelan un estudio sobre los fenómenos que ocurren durante las primeras etapas de la formación de la capa en la deposición de EDS. El Resumen dice "Las soluciones que contienen nitrato de zirconilo disuelto en una mezcla de butil carbitol-agua-etanol (40:40:20 % en vol.) se han rociado sobre sustratos de vidrio calentados." Por tanto, el disolvente 'butil carbitol' también está presente, al ser un butiléter de dietilenglicol.

[0067] De lo indicado anteriormente con respecto a la discusión de la literatura dedicada a la materia, el objeto de la presente invención es por tanto identificar un método que permita evaluar el nivel de poder antioxidante en fluidos biológicos y vegetales de forma fiable, reproducible, repetida y económica, superando de este modo las desventajas indicadas anteriormente con respecto a los métodos conocidos.

Sumario de la invención

[0068] El objeto anteriormente mencionado se ha conseguido por medio de un uso de un reactivo para determinar el poder antioxidante de fluidos biológicos y vegetales que comprenden al menos una sal inorgánica de circonio y al menos un disolvente adecuado, tal como se indica en la reivindicación 1.

[0069] Otro aspecto de la invención se refiere a un método para determinar el poder antioxidante de fluidos biológicos y vegetales tal como se indica en la reivindicación 5.

[0070] Otro aspecto de la invención se refiere a un kit para la aplicación de dicho método, como se indica en la reivindicación 11.

[0071] Las características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción detallada dada a continuación, así como de los ejemplos de trabajo proporcionados con fines ilustrativos y no limitantes.

Descripción detallada de la invención

[0072] Tanto el uso del reactivo como el método de la presente invención, partiendo del principio subyacente al ensayo de BAP utilizado para evaluar el poder antioxidante únicamente de plasma, sorprendentemente ha hecho posible superar, como se verá más ampliamente en adelante, todos los inconvenientes conocidos asociados no solo a dicho ensayo de BAP, sino también a los métodos anteriormente mencionados de la técnica conocida, mientras que al mismo tiempo se consiguen ventajas adicionales absolutamente inesperadas.

[0073] Como ya se ha mencionado, a partir del ensayo de BAP, que se basa en la capacidad para inhibir la reacción entre el tiocianato (SCN^-) y el Fe^{3+}, el inventor en primer lugar ha estudiado las características distintivas de la metodología de dicho ensayo con el fin de recoger información sobre los resultados que este último es capaz de

proporcionar. Dicha información luego se utilizó en una comparación con los resultados obtenidos con el método de la invención, con el fin de probar su eficacia y las mejoras significativas en todos los aspectos considerados.

[0074] Como se sabe, el tiocianato (SCN^-) reacciona con Fe^{3+} para generar el complejo de ferrotiocianato ($Fe[(SCN)_6]^{3-}$); este complejo es de color marrón rojizo y se detecta mediante un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 505 nm. Las sustancias reductoras, dentro de la muestra de fluido a evaluar, reducen el Fe^{3+} a Fe^{2+} eliminándolo así de la reacción con tiocianato y modificando por tanto la absorbancia de la muestra.

[0075] El inventor de la presente invención sorprendentemente ha encontrado que los compuestos que interfieren con la reducción de ion férrico, alterando así la determinación del poder antioxidante resultante con respecto a su valor real, y por tanto dando lugar de hecho a una determinación incorrecta del estado antioxidante real de la muestra, son los fosfatos en las muestras de fluidos biológicos y vegetales.

[0076] En particular, el inventor ha observado que la saliva, por ejemplo, tiene un contenido de fosfato que varía de 1 a más de 50 mg/100 ml, mientras que en el suero la cantidad es de 2,6 a 4,5 mg/100 ml. Por tanto, ya que estas cantidades de fosfatos no son absolutamente despreciables, se puede entender la causa subyacente de las mediciones totalmente inexactas e imprecisas del poder antioxidante con el ensayo de BAP como para producir falsos positivos reales.

[0077] Un problema adicional que surge con el fin de lograr una determinación del poder antioxidante de forma tan repetible y reproducible como sea posible, especialmente si el fluido biológico a analizar es la saliva, es normalizar el flujo de saliva en términos de ml/min, ya que, como se ha dicho, el poder antioxidante varía de una forma inversamente proporcional al propio flujo. El inventor de la presente invención ha encontrado sorprendentemente que para un caudal de 0,70 ml/min a 1,50 ml/min, las concentraciones con las que se evalúa el poder antioxidante no solo son comparables, sino también realmente coincidentes, como se explicará y se demostrará ampliamente en el Ejemplo 2 y Ejemplo 3 a continuación.

[0078] Por consiguiente, la invención proporciona un uso de un reactivo para determinar el poder antioxidante de fluidos biológicos y vegetales que comprenden al menos una sal inorgánica de circonio y al menos un disolvente que es una mezcla de agua-alcohol lineal o ramificado (C_1-C_5). A este respecto, el uso de dicho reactivo permite que la presencia de fosfatos en la muestra de fluido biológico y vegetal se pueda enmascarar, evitando así ventajosamente que dichos fosfatos interfieran con la determinación del poder antioxidante, mientras que al mismo tiempo se mantienen en solución, es decir, evitando una precipitación que desventajosamente produciría una etapa de separación dedicada.

[0079] Este resultado es muy importante para fines diagnósticos, en particular cuando el fluido biológico a analizar es saliva, en el que el equilibrio de la remineralización/desmineralización del esmalte puede generar, como se ha indicado, cantidades de fosfato de incluso > 50 mg/dl, en comparación con el cual el ensayo de BAP demuestra ser totalmente fiable para la determinación del poder antioxidante real de la saliva, sobreestimando incluso los resultados en un 57 % como se evalúa en el Ejemplo 4. Con respecto al suero, en condiciones normales la cantidad media de fosfato no supera 4,5 mg/dl. A pesar de esto, los valores para el poder antioxidante total determinado por BAP se sobreestimaron en un 33 %, evaluado de nuevo en el Ejemplo 4.

[0080] Por tanto, debe tenerse en cuenta la acción de enmascaramiento de los fosfatos sobre el Fe^{3+}, como se ha visto y estudiado por el inventor de la presente invención, cada vez que sea de interés la determinación del poder antioxidante de un fluido (véase también el ensayo de FRAP [21]). De esto se puede apreciar cuán sorprendente y ventajosa es la selección de sales inorgánicas de circonio para el reactivo utilizado en la invención.

[0081] Preferentemente, en dicho reactivo, dicha sal inorgánica de circonio se selecciona del grupo que consiste en fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro, carbonato, sulfato, nitrato y mezclas de los mismos. Más preferentemente, dicha sal inorgánica de circonio se selecciona del grupo que consiste en fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro y mezclas de los mismos.

[0082] Según una realización preferida, dicha sal inorgánica de circonio es $ZrCl_4$.

[0083] Según la presente invención, dicho al menos un disolvente es una mezcla de agua y alcohol inferior, en el que alcohol inferior significa un alcohol lineal o ramificado (C_1-C_5).

[0084] Más preferentemente, se trata de una mezcla de agua y alcohol (C_1-C_3). Según una realización preferida, dicho disolvente es una mezcla de alcohol isopropílico-agua.

[0085] Preferentemente, dicho reactivo comprende además una sal de tiocianato, más preferentemente una sal inorgánica de tiocianato con un metal alcalino o un metal alcalinotérreo.

[0086] En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de dicho reactivo para la determinación del poder antioxidante de fluidos biológicos y vegetales, como también se demuestra ampliamente en los ejemplos

dados.

[0087] Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para determinar el poder antioxidante de fluidos biológicos y vegetales, que comprende las etapas de:

a) proporcionar una solución alcohólica de tiocianato;
b) añadir al menos un reactivo como se ha descrito anteriormente;
c) añadir una solución de sal férrica acuosa;
d) medir la absorbancia de la solución así obtenida;
e) añadir la muestra de fluido biológico o vegetal;
f) medir la absorbancia de la solución que contiene la muestra;
g) restar la absorbancia en la etapa d) de la absorbancia en la etapa f); y
h) dibujar el valor de absorbancia obtenido de este modo en la curva de calibración convencional de la vitamina C y obtener un valor para el poder antioxidante como equivalentes de vitamina C, de acuerdo con la ley de Lambert-Beer, del fluido a examen.

[0088] Para los fines de la presente invención, con el término "fluido biológico o vegetal" se quiere decir cualquier fluido de origen animal o vegetal, tal como saliva, suero, plasma, orina, lágrimas, sudor, fluidos derivados de frutas, verduras, alimentos, vino, cerveza, bebidas, café, té. Preferentemente, dicho fluido biológico es saliva, suero, plasma, orina o lágrimas.

[0089] Sorprendente y ventajosamente se ha observado que, utilizando el reactivo descrito anteriormente, se puede determinar el poder antioxidante de fluidos biológicos y vegetales mediante la adquisición de la absorbancia de la muestra, de una manera rápida, muy simple, repetible y reproducible, ya que la interferencia causada por los fosfatos se excluye completa y efectivamente. Además, el método de la presente invención ventajosamente no requiere sustancias de referencia adicionales, tales como un calibrador, que en el ensayo de BAP es esencial y necesario para el suero, aunque de procedencia y tipo desconocidos.

[0090] Preferentemente, dicha curva de calibración ya está predeterminada en el espectrofotómetro UV-Vis, y así automáticamente suministra un valor para el poder antioxidante del fluido en cuestión como equivalentes de vitamina C (µmol/l). De hecho, como se verá más ampliamente en los Ejemplos 1A-1D a continuación, la curva de calibración de la vitamina C ha demostrado ser muy estable, incluso después de variaciones en las concentraciones de sal férrica y/o variaciones en las concentraciones de la sal de circonio.

[0091] Preferentemente, dicha sal férrica se selecciona del grupo que consiste en fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro, carbonato, sulfato y nitrato. Según una realización preferida, dicha sal férrica es nitrato.

[0092] Preferentemente, dicha sal inorgánica de circonio del reactivo b) y dicha sal férrica se encuentran en una relación molar de 20:1 a 5:1. Más preferentemente, dicha sal inorgánica de circonio y dicha sal férrica están en una relación molar de 15:1 a 8:1. De acuerdo con una realización preferida, dicha sal inorgánica de circonio y dicha sal férrica están en una relación molar de aproximadamente 10:1.

[0093] Estas relaciones molares, por tanto, significan un exceso de circonio con respecto a los iones de Fe^{3+}, ya que esto facilita considerablemente la tarea de enmascarar eficazmente los fosfatos con sales de circonio, así como su mantenimiento en solución y prevenir su precipitación, como también se verá en el Ejemplo 6.

[0094] Preferentemente, dicha muestra de fluido biológico o vegetal y la solución obtenida después de la etapa c) están en una relación volumétrica de 1:250 a 1:50. Más preferentemente, dicha muestra de fluido biológico o vegetal y la solución obtenida después de la etapa c) están en una relación volumétrica de 1:180 a 1:75. Incluso más preferentemente, dicha muestra de fluido biológico o vegetal y la solución obtenida después de la etapa c) están en una relación volumétrica de 1:120 a 1:90.

[0095] Estas relaciones en realidad se han encontrado que aumentan la probabilidad de que la determinación de la resistencia volumétrica caiga directamente dentro de los límites establecidos para la curva de calibración de la vitamina C (500-6000 µmol/l) sin necesidad de otras diluciones.

[0096] Con respecto a los volúmenes de muestras de fluidos biológicos o vegetales, ya que el análisis se lleva a cabo en un espectrofotómetro UV-Vis, se consideran los volúmenes adecuados para su introducción en una cubeta. A este respecto, se observó que para la saliva, las lágrimas, y el sudor se prefieren volúmenes de aproximadamente 5 µl, para la sangre (suero o plasma) de 10 µl, mientras que para la orina de 10 µl, pero después de haber sido diluido 1:5 con H_2O desionizada.

[0097] Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit para la realización del proceso descrito anteriormente, que comprende:

i) al menos un reactivo como se ha descrito anteriormente;
ii) al menos una solución alcohólica de tiocianato;
iii) al menos un solución acuosa de una sal férrica; y
iv) un folleto ilustrado que comprende las instrucciones para llevar a cabo la determinación del poder antioxidante.

[0098] El resultado ventajoso ha sido simplificar significativamente los componentes necesarios para la determinación del poder antioxidante de fluidos biológicos o vegetales en el sentido de que, en contraste con el ensayo de BAP, el kit de la invención no comprende calibrador en absoluto, es decir, suero de referencia. De hecho, puesto que el método de la presente invención se refiere directamente a la curva de calibración de la vitamina C, no hay necesidad de una muestra de referencia, ni para el suero ni por cualquier otro fluido, consiguiendo por tanto una serie de ventajas notables como una mejor repetibilidad, mejor reproducibilidad, coste reducido y una excelente fiabilidad de los resultados como se demuestra también en los siguientes ejemplos, en particular en los Ejemplos 4 y 5.

[0099] Preferentemente, dicho i) al menos un reactivo y dicha ii) al menos una solución alcohólica de tiocianato son una única solución (1).

[0100] En una realización preferida, dicho folleto ilustrativo comprende además instrucciones para la recogida de la muestra de fluido biológico y vegetal. Más preferentemente, cuando dicho fluido biológico es saliva, dichas instrucciones adicionales para la recogida de muestras indican que dicha recogida se lleva a cabo en condiciones para que dicho flujo de saliva sea de 0,70 a 1,50 ml/min. Aún más preferentemente, dichas instrucciones adicionales para la recogida de muestras indican que dicha recogida se lleva a cabo en condiciones para que el flujo de saliva sea de 1,00 a 1,30 ml/ml dicho. En una realización preferida, dicho flujo de saliva es de aproximadamente 1,20 ml/min.

[0101] Debe entenderse que todos los aspectos identificados como preferidos y ventajosos para el método de la invención también se deben considerar preferidos y ventajosos de manera similar para el kit y el uso de los mismos.

[0102] A continuación se proporcionan Ejemplos de trabajo de la presente invención para fines ilustrativos y no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1. Método para determinar el poder antioxidante de la saliva, el plasma y la orina, según la presente invención

[0103] Se prepararon los siguientes componentes:

		Cantidad	Volumen
Muestra			10 µl
Solución (1)	Alcohol isopropílico		600 µl
	H_2O desmineralizada		355 µl
	$ZrCl_4$	47,20 mmol	5 µl
	KSCN	0,11 mmol	10 µl
Solución (2)	$Fe(NO_3)_3$	5,01 mmol	30 µl
Total			1010 µl

[0104] La Solución (1) se preparó combinando la solución de cloruro de circonio y la solución alcohólica de tiocianato; a continuación, se introdujo esta solución (1) en una cubeta para el análisis espectrofotométrico UV-Vis. A continuación se añadió la solución (2), virando así el color de transparente a marrón rojizo, cuya intensidad es proporcional a la presencia de Fe^{3+} que ha reaccionado con el tiocianato. Inmediatamente después, se identificó la longitud de onda correspondiente al pico máximo de absorbancia medido por espectrofotómetro que en este caso es de 505 nm.

[0105] Posteriormente, la muestra también se añadió a la cubeta. Después de 5 minutos, se repitió la lectura de absorbancia. La diferencia entre la primera y la segunda lectura de absorbancia permitió obtener la concentración en términos de µmol/l de vitamina C, por medio de la ley de Lambert-Beer, y por tanto el poder antioxidante de la muestra analizada.

[0106] A este respecto, se utilizó la vitamina C como patrón para la calibración del método, ya que mostraba valores lineales entre 500 y 6000 µmol/l, como se demuestra en el Ejemplo 1A a continuación. Para concentraciones > 6000 µmol/l, la muestra se diluyó adecuadamente con agua desionizada, hasta que sus valores cayeron dentro de

500 y 6000 µmol/l de vitamina C.

Ejemplo 1 A. Linealidad del método de la presente invención

[0107] El objetivo del Ejemplo 1A fue demostrar la linealidad de la determinación del método de la invención entre los valores 500 y 6000 µmol/l de vitamina C, que se usó como referencia para determinar el poder antioxidante de fluidos correspondientes.

[0108] En primer lugar, se observó que el valor máximo de absorbancia de las soluciones (1) y (2) juntas, como en el Ejemplo 1, correspondía a una concentración de 7,134 ± 67,7 µmol/l con un CV <1 % (donde el CV es el coeficiente de variación). Este valor se obtiene restando la lectura del blanco, es decir, de la solución (1) por sí sola, de la lectura de las soluciones (1) y (2) juntas.

[0109] Para desarrollar la curva de calibración como función de cantidades escalares de vitamina C, se prepararon diferentes soluciones de vitamina C, a concentraciones escalares a partir de 500 µmol/l con el multiplicador (2, 4, 8, 10, 12) obtenido diluyendo vitamina C con agua desmineralizada en una solución concentrada (35,22 mg/ml) en agua desmineralizada.

[0110] Las determinaciones se llevaron a cabo 5 veces para cada dilución, con las mediciones que se toman con diferentes sucesiones; para la mitad de las muestras, con concentraciones crecientes (de 500 a 6000 µmol/l) y para la otra mitad con concentraciones decrecientes (de 6000 a 500 µmol/l). Todas las mediciones se llevaron a cabo durante el mismo día en condiciones controladas de temperatura (25 ºC).

[0111] Los valores se analizaron estadísticamente mediante la aplicación de la prueba t de Student entre las determinaciones reales y los valores esperados; todos los datos se dan en la Tabla 4.

Tabla 4. Determinaciones para diferentes concentraciones de vitamina C. Valores medios ± DE de 5 determinaciones

Variables	Concentraciones de vitamina C (µmol/l)						
	500	1000	2000	4000	5000	5500	6000
Datos reales (µmol/l)	505 ± 16,2	1007 ± 35,7	2020 ± 65,7	4036 ± 129,0	5046 ± 161,5	5556 ± 176,9	6196 ± 186,0
CV (%)	3,2	3,5	3,3	3,2	3,3	3,2	3,0
Datos esperados (µmol/l)		1009 ± 32,4	2018 ± 64,8	4037 ± 129,6	5046 ± 162,0	5550 ± 178,2	6055 194,3
Prueba t para datos independientes (valores t)		0,921 *	0,974 *	0,989 *	0,998 *	0,960 *	0,276 *
* Prueba t para datos reales interdependientes frente a datos esperados: p> 0,05							

[0112] Como se puede observar del análisis de los datos dados en la Tabla 4, la curva de calibración es perfectamente lineal, es decir, en realidad es una línea recta con valores de hasta 6000 µmol/l con un CV que varía del 3,0 % al 3,5 %.

Ejemplo 1B. Evaluación del efecto de la cantidad de sal férrica en la curva de calibración de la vitamina C

[0113] Este ejemplo se realizó para demostrar que las diferentes cantidades de sal férrica en la solución (2) no daban lugar a alteraciones significativas en la determinación de los valores de µmol/l de vitamina C.

[0114] Para este propósito se llevó a cabo la determinación en las mismas muestras que en el Ejemplo 1A, utilizando únicamente las concentraciones convencionales de vitamina C de 2000 y 4000 µmol/l y la adición de tres volúmenes diferentes de la misma concentración de $Fe(NO_3)_3$, es decir, 25 µl-30 µl-35 µl.

[0115] El análisis de la varianza (ANOVA) se calculó sobre los datos.

[0116] Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Determinaciones sobre dos concentraciones de vitamina C con el $Fe(NO_3)_3$ añadido a diferentes volúmenes. Los valores medios ± DE en 5 muestras

Volúmenes de $Fe(NO_3)_3$	25 µl	30 µl	35 µl	ANOVA
2000 µmol/l	2023 ± 58,0	2020 ± 65,7	2026 ± 63,5	p> 0,05
4000 µmol/l	4041 ± 123,1	4036 ± 129,0	4043 ± 130,2	p> 0,05

[0117] Este ensayo confirmó que no se observaron variaciones significativas cuando se usan volúmenes entre 25 y 35 µl de $Fe(NO_3)_3$ a la misma concentración.

Ejemplo 1C. Evaluación de la posible interferencia por sales de Zr sobre la curva de calibración de vitamina C

[0118] El ejemplo se realizó para demostrar que las sales inorgánicas de Zr no interferían, es decir, no alteraban, la linealidad de la curva de calibración de la vitamina C. La vitamina C se utilizó como muestra de comparación con dos soluciones diferentes (1):

- Solución (1)-AcZ, es decir, que contiene Zr en forma de $ZrCl_4$, y
- Solución (1)-AsA, es decir, sin Zr.

[0119] La muestra consistía en una solución de 2000 µmol/l de vitamina C en agua desionizada. La solución de vitamina C se preparó 10 veces seguidas; para cada muestra de vitamina C, el ensayo se llevó a cabo usando ambas soluciones (1) en sucesión inmediata.

[0120] Durante cinco veces, la solución (1)-AcZ se evaluó antes de la solución (1)-AsZ y durante 5 veces después de ella. La concentración de $ZrCl_4$ era de 47,2 mmol/l y el volumen introducido en la cubeta fue de 5 µl.

[0121] El coeficiente de variación (% de CV) también se evaluó en estas muestras.

[0122] Los datos se compararon usando la prueba t para datos interdependientes y se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Determinaciones en una solución de vitamina C a una concentración de 2000 µmol/l en presencia o ausencia de $ZrCl_4$. Valores medios ± DE.

	Valores en µmol/l de vitamina C	% de CV	P
Solución (1)-AsZ	2031 ± 73,1	3,6	ns
Solución (1)-AcZ	2040 ± 42,2	2,1	
Ns = p <0,05 prueba t para datos interdependientes			

[0123] De los datos presentados más arriba se desprende que la adición de sales inorgánicas de Zr ventajosamente no modificó la curva de calibración de la vitamina C; además, se observó que la presencia de sales inorgánicas de Zr redujo convenientemente de forma significativa el % de CV.

Ejemplo 1D. Evaluación de diferentes muestras de fluidos biológicos humanos

[0124] El método de la invención se evaluó usando diferentes cantidades de diferentes muestras de fluidos biológicos.

[0125] Para este propósito, se examinaron muestras de orina, saliva y lágrimas procedentes de los mismos 10 sujetos, todos voluntarios sanos.

[0126] Su saliva se recogió en un recipiente de plástico tras la masticación en algodón, en una cantidad de > 1 ml; la orina se recogió externamente en un recipiente de plástico en una cantidad de 20 ml; las lágrimas se recogieron en una microcubeta después de la exposición durante un tiempo muy corto (3 segundos) a orto-cloro-benzal malonitrilo gaseoso bajo una campana extractora. Las lágrimas se recogieron en una cantidad mínima de 100 µl. Esta determinación final se llevó a cabo solo sobre 5 casos (3 hombres y 2 mujeres).

[0127] Las características de los voluntarios que participaron en la investigación se dan a continuación (valores medios ± DE):

Variables	Valores
Años de edad)	23 ± 1,7
Género	5 H y 5 M

[0128] Todas las muestras se analizaron el día de la recogida; la mitad de los casos se evaluó con la sucesión de 5 µl a 10 µl, mientras que la otra mitad con la sucesión inversa.

[0129] Las muestras de orina se diluyeron en una proporción de 1:5 con agua desionizada.

[0130] Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Determinaciones en muestras de fluidos biológicos. Valores medios ± DE

	Número de casos	Cantidades en µl		P*
		5	10	
Saliva (µmol/l)	10	1127 ± 179,9	2250 ± 355,5	ns
Orina (µmol/l)	10	2178 ± 205,9	4358 ± 413,4	ns
Lágrimas (µmol/l)	5	1199 ± 182,6	2394 ± 371,8	ns
* Prueba t para datos interdependientes que comparan los valores de 10 µl con los de 5 µl multiplicado por 2; Ns = p> 0,05				

[0131] De acuerdo con el método de la invención, por tanto, se consigue una determinación del poder antioxidante de las muestras mediante la lectura de la absorbancia y el cálculo de la concentración correspondiente, por medio de la ley de Lambert-Beer, en términos de equivalentes de vitamina C en µmol/l, después de multiplicar por un factor de 6,500.

Ejemplo 2. Normalización de la cantidad de saliva para su uso como muestra en el método de la invención

[0132] Cuando el fluido biológico a analizar es la saliva, en vista de su complejidad analítica, se consideró la conveniencia de normalizar su recogida. En primer lugar, esta recogida se realizó con posterioridad a las medidas de higiene oral diarias utilizando pasta de dientes y/o hilo dental y/o enjuague bucal dental. La saliva se recogió al menos una hora después de dichos procesos de higiene.

[0133] Por tanto, la saliva se recogió pidiendo al sujeto, mientras se encuentra cómodamente sentado, que masticase un poco de algodón hidrófilo preparado adecuadamente en una cantidad de 300 ± 30 mg durante un período de 60 segundos.

[0134] El sujeto en promedio alcanza no más de 60 ± 2 masticaciones sin compresión excesiva del algodón entre los dientes, sino moviéndolo dentro de la boca durante la masticación.

[0135] Cuando se terminó la masticación, el algodón se recoge en un recipiente adecuado, cuyo peso estaba representado por la suma del peso del recipiente más el del algodón (tara). Después de restar la tara, se evaluó el nivel de fluido que representa el flujo de saliva/ min. En condiciones óptimas para el método de la invención, dicho flujo fue de 1,2 ± 0,2 ml/min.

[0136] Si la cantidad obtenida no estaba en la región de dichos valores, se tuvo que repetir la recogida de saliva después de un intervalo de al menos 5 minutos, hasta que se logra la cantidad deseada modulando la masticación; es decir, el aumento de la masticación en caso de flujo bajo o su reducción en caso de flujo alto. En caso de que el flujo sea muy bajo, siendo este un evento infrecuente pero posible, se podría usar la misma cantidad de algodón, pero con la adición de una gota (45 µl) de solución de ácido cítrico al 3 %. De este modo, casi el 100 % de los sujetos con un flujo de saliva <0,5 ml/min fueron capaces de aumentar el flujo de saliva a los niveles adecuados para la evaluación, es decir, entre 0,70 y 1,5 ml/min.

[0137] Las determinaciones después de la centrifugación de la muestra de saliva fueron siempre idénticas a muestras no centrifugadas a 800 rpm. La centrifugación, por tanto, solo podía ser útil en caso de ser evidente detritus salival en la saliva.

[0138] En vista de los resultados obtenidos anteriormente por el método de la presente invención, junto con los expedientes para la toma de muestras en el caso específico de la saliva, se lograron una alta repetibilidad y reproducibilidad del método como se demuestra en los siguientes Ejemplos 3-6.

Ejemplo 3. Impacto del flujo de saliva en la determinación del poder antioxidante de la saliva de acuerdo con el método de la invención

[0139] Se seleccionaron 10 sujetos de ambos sexos (5 hombres y 5 mujeres) formalmente sanos. En este sentido, los criterios de admisión requerían que no fuesen fumadores, no hayan seguido ningún tratamiento, incluyendo el control de la natalidad, ni estuvieran tomando ningún suplemento alimenticio.

[0140] Los sujetos tenían que presentarse en ayunas desde la noche anterior y se les pidió que evitasen el exceso de comida durante todo el día previo al ensayo, así como el ejercicio físico excesivo.

[0141] El ensayo se llevó a cabo a una temperatura controlada de 25 ℃. Los sujetos se mantuvieron en condiciones de reposo durante 30 minutos antes de evaluar el flujo y el poder antioxidante de la saliva.

[0142] Se llevaron a cabo mediciones de los flujos de saliva de acuerdo con el siguiente método.

[0143] El sujeto sentado tenía que masticar un pequeño cuadrado de algodón hidrófilo de 300 ± 30 mg. Es necesario masticar el algodón durante un período de un minuto sin comprimir en exceso entre los dientes, pero permitiendo que se mueva dentro de la boca. Es necesario mantener un ritmo de aproximadamente 60 masticaciones/minuto permitiendo que la saliva fluya hacia el algodón.

[0144] Al final de un minuto, el algodón fue expulsado de la boca y se recoge en un recipiente de plástico adecuado de peso conocido. Se pesó el total y la resta de la tara del recipiente y el peso de algodón proporcionó el peso de saliva y por tanto se determina su flujo.

[0145] Esta evaluación se repitió después de 10 minutos para obtener una determinación más precisa de la capacidad de los diversos sujetos para producir saliva.

[0146] Dependiendo de flujo de saliva, se le pide al sujeto que modifique el número de masticaciones y la activación de la saliva. Si el flujo era inferior a 0,70 ml/min se pidió a los sujetos que aumentase el número de masticaciones y su esfuerzo para producir saliva. Si el flujo era mucho mayor que 1,50 ml/min (por ejemplo, por encima de 3 ml/min) se pidió a los sujetos que redujesen las masticaciones.

[0147] Si el flujo de saliva era demasiado bajo, se podría añadir una solución de ácido cítrico (45 µl de una solución acuosa al 3 %) para aumentar su cantidad, pero ninguno de los sujetos a ensayo lo precisó.

[0148] Cada sujeto fue sometido a tres pruebas de acondicionamiento que se llevaron a cabo el día antes del comienzo del ensayo real.

[0149] El protocolo comprendía la evaluación de 5 flujos de saliva diferentes, en concreto:

- de 0,3 a 0,60 ml/min;
- de 0,6 a 0,9 ml/min;
- de 0,91 a 1,3 ml/min;
- de 1,31 a 1,8 ml/min; y
- de 1,81 a 2,5 ml/min.

[0150] Esta capacidad para producir flujos de saliva diferenciados se consideró un criterio de admisión: en efecto, los 10 sujetos finales se obtienen mediante el cribado de 15 sujetos. Los casos rechazados se debieron a una producción escasa (3 sujetos) o la dificultad para estimular adecuadamente el flujo de saliva (2 sujetos), es decir, el flujo no se puede modificar en la medida necesaria.

[0151] Después de las pruebas de acondicionamiento, el ensayo se repitió sobre los mismos sujetos tres veces al día (1, 3 y 5) con el objetivo de determinar la repetibilidad de los datos.

[0152] Las sesiones en el primer día de la evaluación se denominaron "flujos 1, 2, 3, 4, 5", mientras que en los días siguientes se denominaron flujo 6 (el tercer día) y flujo de 7 (el quinto día).

[0153] El primer día de la evaluación real se analizó el poder antioxidante de los cinco flujos de saliva, mientras que los otros dos ensayos en días posteriores (día 2 y el día 5) evaluaron solo los valores de flujo que se consideran ideales para el ensayo (como se verá a continuación) es decir, entre 1 y 1,5 ml/min.

[0154] Se determinó el poder antioxidante total en saliva utilizando el método de la invención, trabajando por tanto con una cantidad de saliva de 10 µl.

[0155] Todos los datos se analizaron estadísticamente mediante el cálculo de la media y los parámetros de dispersión (DE o desviación típica) y las comparaciones se hicieron sobre la base de la prueba t de Student para datos interdependientes, así como el análisis de la varianza para contrastes ortogonales.

Resultados

[0156] Las características de los 10 sujetos se dan a continuación:

Variable	Valores
Género	5 H y 5 M
Años de edad)	28 ± 6,7
Peso (Kg)	67 ± 10,5
Altura (m)	1,68 ± 0,083
IMC * (kg/m^2)	23,4 ± 1,60

Variable	Valores
* IMC = índice de masa corporal	

[0157] Todos los sujetos completaron con éxito el ensayo. Las mediciones de flujo de saliva y las concentraciones relativas en términos de µmol/ml de vitamina C, durante los primeros días de seguimiento de los diferentes flujos, se dan en la Tabla 8 a continuación.

[0158] También se calcula el producto del "ensayo de flujo x", siendo ésta una expresión de la capacidad oxidativa total (CT). Todas las mediciones se llevaron a cabo usando 10 µl, y los valores se expresaron como µmol/l de vitamina C. El examen de los datos mostraba que cuando el flujo medio variaba de 0,75 ml/min a 1,14 ml/min los valores de ensayo prácticamente se igualan. Flujos inferiores a 0,70 ml/min o superiores a 1,50 ml/min mostraban concentraciones más altas o más bajas, respectivamente, en ambos casos de manera significativa (prueba t, p <0,05). Por tanto, se puede concluir que, al mantener un flujo de saliva de 0,70 ml/min a 1,5 ml/min, las concentraciones resultantes en términos de µmol/l de vitamina C varían de forma despreciable.

Tabla 8. Volúmenes de saliva (ml/min) y concentraciones en términos de µmol/l de vitamina C. Valores medios ± DE.

Variables	Valores	Capacidad total (CT) [Flujo x ensayo]
Flujo 1	0,43 ± 0,095	
ensayo 1	4316 ± 381,5	1846 ± 383,8
Flujo 2	0,75 ± 0,085[a]	
ensayo 2	3753 ± 301.4	2804 ± 299,1[c]
Flujo 3	1.10 ± 0.082[a]	
ensayo 3	3492 ± 282,2[b]	3840 ± 397,0[cd]
Flujo 4	1,44 ± 0,070[a]	
ensayo 4	3483 ± 265,1[b]	5006 ± 312,5[cd]
Flujo 5	2.31 ± 0.197[a]	
ensayo 5	2075 ± 280,2	6053 ± 698,0[cd]

[a] prueba t para datos interdependientes: p <0,05 para Flujo 1 frente a Flujo "n"
[b] prueba t para datos interdependientes: p <0,05 ensayo 3 frente a ensayo 4
[c] prueba t para datos interdependientes: p <0,05 comparación de CT 1 frente a CT "n"
[d] contrastes ortogonales ANOVA: p <0,05 la secuencia CT 5 > CT 4 > CT 3

[0159] Se encontró que a flujos medios desde 1,10 ml/min a 1,44 ml/min (flujo 3, flujo 4), aumentó la cantidad de capacidad antioxidante total. Esto confirma además el hecho de que los flujos moderados eran óptimos para la normalización de la evaluación del poder antioxidante de la saliva.

[0160] En el contexto del ejemplo actual, se determinaron dos veces más las evaluaciones de flujo de saliva y la capacidad antioxidante total relativa, en concreto, después de 3 y 5 días (flujo 6 y flujo 7, respectivamente).

[0161] Los resultados, mostrados en la Tabla 9, demostraron que no había variaciones significativas notables (ANOVA p> 0,05) entre los valores adquiridos para los flujos estimulados los días 1, 3 y 5, lo que confirma la alta reproducibilidad del método de la invención.

Tabla 9. Valores de la saliva estimulada entre 1 ml/min y 1,5 ml/min en los días posteriores. Valores medios ± DE.

Días	Variables	Valores	Capacidad total (CT) [producto de flujo x TAS]
1	Flujo 3	1,10 ± 0,082	
	ensayo 3	3492 ± 282,2	3840 ± 397,0
3	Flujo 6	1,13 ± 0,082	
	ensayo 6	3461 ± 254,6	3916 ± 452,5
5	Flujo 7	1,14 ± 0,084	

Días	Variables	Valores	Capacidad total (CT) [producto de flujo x TAS]
	ensayo 3	3493 ± 263,2	3983 ± 417,9

Ejemplo 4. Comparación entre el método de la invención y el ensayo de BAP en saliva y plasma

[0162] En este ejemplo se realizó una comparación entre el método de la invención y el ensayo de BAP, que, como se ha mencionado anteriormente, se diseñó y se utilizó exclusivamente para evaluar el poder antioxidante de plasma o suero.

[0163] Los dos métodos se compararon con las mismas muestras procedentes de los mismos sujetos y se recogen a la misma hora, con el fin de hacer la propia comparación tan consistente y significativa como sea posible.

[0164] Se seleccionaron 12 sujetos (6 hombres y 6 mujeres), diez de los cuales eran los mismos que los del ejemplo anterior. En uno de los casos examinados, se extrajo suficiente saliva y sangre para poder determinar el coeficiente de variación (% de CV) después de 10 determinaciones sucesivas.

[0165] La comparación de corriente se llevó a cabo en periodos de tiempo posteriores a los del ejemplo anterior.

[0166] Los criterios de admisión fueron idénticos a los del ejemplo anterior. Las características generales de los sujetos se muestran a continuación:

Variable	Valores
Género	6 H y 6 M
Años de edad)	29 ± 6,2
Peso (Kg)	68 ± 10,8
Altura (m)	1,69 ± 0,090
IMC (kg/m^2)	23,6 ± 1,50

[0167] Para la recogida de la saliva, se siguió el método dado en el Ejemplo 2.

[0168] Las dos pruebas, en concreto, BAP y el método de la invención, se determinaron sobre la misma muestra de forma secuencial. Una vez más utilizando la misma muestra, también se determinó la cantidad de fosfato, por aplicación del método de Dick y Tabatabai [19] con el volumen total de la muestra reducido hasta 1 ml [20]. Para dichas determinaciones, a veces fue necesario (cuando la cantidad era de poco más de 1 ml) repetir la recogida de saliva en dos sesiones de estimulación (separadas por al menos 10 minutos). Cuando esto sucedió (solo en 2 ocasiones) las dos tomas de saliva se mezclaron. La sangre para la evaluación de los fosfatos se recogió de la vena braquial, una cantidad de 5 ml que se extrae en tubos que se centrifugaron inmediatamente para la separación del suero. Las determinaciones tanto en la saliva como en suero, usando BAP y el método de la invención, se llevaron a cabo durante la mañana de la recogida. A medida que se llevaron a cabo las determinaciones de BAP y el método de la invención sobre las mismas muestras, la comparación directa tenía la máxima importancia, que era independiente de todas las otras variables.

[0169] Todos los datos fueron procesados para calcular los valores medios y la DE; para evaluar las diferencias entre los dos tipos de ensayo se aplicó la prueba t de Student. Entre los diversos valores, también se calcularon los coeficientes de correlación.

Resultados

[0170] Todos los sujetos completaron el estudio, con los valores de BAP y del método de la invención que se muestran en la Tabla 10 junto con el contenido de fosfato de la sangre y la saliva.

[0171] Cabe señalar que, si bien ambos métodos miden la capacidad de un fluido para reducir el Fe^{3+} y los dos en términos de µmol/ml de vitamina C, mediante el ensayo de BAP se obtuvieron valores mucho más altos que el método de la invención (en promedio en un 57 % en la saliva y en un 30 % en el suero).

[0172] Se pudo observar que en todos los casos la determinación BAP tuvo realizarse reduciendo el volumen de muestra de 10 µl a 5 µl ya que con 10 µl, se obtuvieron los valores de > 3000 µmol/ml que se encontraban en el límite superior de la linealidad indicada para dicho ensayo de BAP.

Tabla 10. Determinaciones del poder antioxidante de la saliva y el suero en sujetos sanos mediante el ensayo de BAP y el método de la invención, en comparación con los respectivos niveles iniciales de fosfato en saliva y suero (valores medios ± DE)

	Saliva	Suero	Correlaciones	"r"	P
Método de la invención (µmol/l)	3442 ± 387,0	1559 ± 176,2	Saliva frente a suero	0,011	ns
BAP (µmol/l)	5412 ± 465,6	2070 ± 257,1	Saliva frente a suero	0,340	ns
Fosfatos (mg/dl)	10,5 ± 4,35	3,5 ± 0,66	Fosfatos salivales frente a fosfatos en suero	0,875	<0,05
			Fosfatos en suero frente a suero BAP	0,635	<0,05
			Fosfatos salivales frente a saliva BAP	0,756	<0,05
			Fosfatos en suero frente a suero del método de la invención	0,038	ns
			Fosfatos salivales frente a saliva del método de la invención	-0,085	ns

[0173] La medición del % de CV en las diez determinaciones sucesivas fueron, respectivamente, del 3,3 % para la saliva y el 2,9 % para el suero [los valores medios ± desviación típica de las 10 determinaciones fueron de 3794 ± 126,7 para la saliva y 1513 ± 44,0 para el suero].

[0174] Con respecto a las correlaciones, éstos indican la existencia de una relación entre los fosfatos de suero y los fosfatos salivales. El valor más importante para los fines del estudio fue la evidencia experimental de una interferencia directa y significativa entre BAP y los fosfatos en las determinaciones tanto en suero como en saliva.

[0175] Esta interferencia convenientemente no se observó para el método de la invención, cuyos resultados fueron sorprendentes y ventajosos independientemente de la presencia de fosfatos, proporcionando así valores de poder antioxidante extremadamente fiables debido a la selección apropiada de los componentes utilizados en dicho método. Este hecho era extremadamente importante para fines diagnósticos, en particular cuando el fluido biológico a analizar era saliva, en el que el equilibrio entre la remineralización y la desmineralización del esmalte puede generar niveles de fosfato aún mayores que 50 mg/dl, en comparación con lo cual el BAP ha demostrado ser totalmente fiable en la determinación del poder antioxidante real de la saliva, sobreestimando en realidad los resultados en un 57 %.

[0176] Con respecto al suero, las cantidades medias de fosfatos no superaron los 4,5 mg/dl en condiciones normales. Sin embargo, se encontró que los valores para el poder antioxidante total determinado por BAP se sobreestimaban incluso en un 33 %.

[0177] De lo anterior es evidente que la selección de las sales inorgánicas de circonio para el reactivo utilizado en la invención es sorprendente y ventajosa.

Ejemplo 5. Comparación entre el método de la invención y el ensayo de BAP sobre orina

[0178] De manera similar a la del Ejemplo 4, en este ejemplo se llevó a cabo una comparación sobre la orina entre los resultados que se pueden obtener con el ensayo de BAP y los resultados que se pueden obtener con el método de la invención.

[0179] Con este objetivo, se emplearon los mismos sujetos que en el Ejemplo 4.

[0180] Se recogió la orina a las 13:30 horas; se pide al sujeto que vacíe la vejiga a las 7:30 de la mañana. Después, toda la orina posterior a la de las 7:30 horas se tuvo que recoger en un recipiente adecuado y se mantiene en el refrigerador. A las 12:30 horas, el sujeto vació la vejiga en el recipiente de recogida. De esta manera, se obtuvo la cantidad de orina producida en un período de 6 horas.

[0181] Las determinaciones del poder antioxidante de la orina de acuerdo con los dos ensayos se llevaron a cabo mediante la dilución de las muestras de orina en una proporción 1:5 (1 + 4) y el uso de volúmenes relativos de 10 µl.

[0182] La evaluación de los fosfatos en la orina se consigue aplicando el mismo método que se utiliza para el plasma y la saliva [19]. En un caso, se llevaron a cabo 10 evaluaciones sucesivas sobre la muestra de orina con el fin de determinar el % de CV del poder antioxidante de la orina según el método de la invención.

[0183] Los valores medios y los parámetros de dispersión se calcularon sobre todos los datos y también se determinaron las correlaciones entre las concentraciones de fosfato en orina derivadas de los dos ensayos.

Resultados

[0184] Todos los sujetos terminaron con éxito el estudio en el mismo laboratorio analítico.

[0185] Los análisis de las muestras de orina por medio de los dos ensayos se realizaron en muestras diluidas 1:5, utilizando 10 µl para el análisis. Esa misma tarde también se llevaron a cabo los análisis del fosfato.

[0186] Los resultados se dan en la Tabla 11.

Tabla 11. Determinación del poder antioxidante de la orina en sujetos sanos por BAP y el método de la invención, en relación con los respectivos niveles iniciales de fosfato (valores medios ± DE)

	Orina	Correlaciones	"r"	P
Volumen (ml)	415 ± 82,2			
Fosfatos (mg/dl)	281 ± 82,2			
Método de la invención (µmol/l)	1970 ± 265,2	Método de la invención frente a fosfatos	0,095	ns
BAP (µmol/l)	4210 ± 590,4	BAP frente a fosfatos	0,706	<0,05

[0187] Al estudiar los datos, se desprende que los valores de acuerdo con el método de la invención claramente difieren de los de BAP y que los valores medios de BAP en realidad superaron a los del método de la invención en un 110 %, debido al alto contenido de fosfato en la orina. De hecho, de nuevo en este caso se confirmó una interferencia significativa por los fosfatos en el ensayo de BAP, como se deduce de la correlación entre los valores de ensayo de BAP y los fosfatos ($r = 0,706$, $p < 0,05$).

[0188] Sin embargo, en lo que se refiere al método de la invención, sorprendente y ventajosamente se confirmó que no había correlación entre los valores encontrados para el poder antioxidante y la cantidad de los fosfatos presentes en las muestras.

[0189] El % de CV del método de la invención para la orina resultó ser del 3,7 % [derivado del valor medio ± DE igual a 1820 ± 66,7].

Ejemplo 6. Evaluación del poder antioxidante de la saliva de acuerdo con el método de la invención, antes y después de su centrifugación

[0190] Para este ejemplo, se evaluaron 20 sujetos (10 hombres y 10 mujeres) que frecuentan una clínica dental para su revisión rutinaria.

[0191] También se incluyeron sujetos con prótesis, pero se excluyeron los pacientes afectados por enfermedad periodontal o con abscesos dentales.

[0192] El único requisito era limpiar previamente los dientes con pasta de dientes y/o hilo dental después de comer el desayuno o la comida o cualquier alimento o bebida antes del período de observación.

[0193] Los ensayos se realizaron en el transcurso del mismo día entre las 10:00 y las 19:00 horas.

[0194] Las características generales de los sujetos examinados se dan a continuación:

Variable	Valores
Género	10 H y 10 M
Años de edad)	40 ± 15,0
Peso (Kg)	70 ± 8,1
Altura (m)	1,68 ± 0,091
IMC (kg/m^2)	24,9 ± 2,61

[0195] La recogida de saliva siguió la metodología ilustrada en el ejemplo anterior 2.

[0196] La prueba t para datos interdependientes se aplicó a los valores obtenidos antes y después de la centrifugación con el fin de determinar si las diferencias eran estadísticamente significativas. La determinación se realizó sobre 5 µl de saliva y el valor se multiplica por 2.

[0197] Los resultados se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Determinaciones del poder antioxidante de la saliva de acuerdo con el método de la invención, antes y después de la centrifugación (valores medios ± DE)

	Valores
Volumen de saliva (ml)	1,1 ± 0,20
Det. antes de la centrifugación (µmol/l)	2760 ± 354,0
Det. después de la centrifugación (µmol/l)	2741 ± 360,7

p> 0,05 prueba t para datos interdependientes

[0198] Como se desprende de los datos de la media y el análisis estadístico, no hubo diferencias significativas entre los valores obtenidos antes y después de la centrifugación, ya que los componentes utilizados en el método de la invención, en particular las sales de circonio, de forma sorprendente y ventajosa no indujeron la precipitación de los fosfatos, pero enmascaran efectivamente su presencia mientras los mantiene en solución.

Ejemplo 7. Evaluación del TAS en una comparación entre sujetos normales y afectados por paradontosis

[0199] En el ejemplo actual, se evaluaron los niveles del poder antioxidante de la saliva comparando sujetos aparentemente sanos con los afectados por paradontosis de diferentes grados clínicos.

[0200] 100 sujetos se pusieron en observación, subdivididos en dos grupos de 50 sujetos cada uno.

[0201] Todos los sujetos frecuentaban la misma cirugía dental para su higiene dental.

[0202] Por tanto era posible identificar aquellos sujetos que simplemente realizaban revisiones dentales bianuales o anuales, así como sujetos que reciben tratamiento para paradontosis de diversos grados.

[0203] Los niveles de paradontosis se distinguieron usando una escala de 1 a 4 semi-cuantitativa mediante la cual 1 representa el nivel "leve" y 4 el nivel "grave". La gravedad se determina principalmente por el número de cuadrantes arco dentales afectados por la enfermedad, así como el grado de daño de las encías (retracción de las encías e inflamación de las encías).

[0204] Los sujetos afectados por paradontosis también tenían otras patologías asociadas, principalmente hipertensión y/o dislipidemia; los pacientes solo fueron admitidos si estaban bajo control terapéutico con un tratamiento establecido durante al menos dos meses.

[0205] Los criterios de admisión para los sujetos aparentemente sanos no permitían ninguna otra patología o tratamientos farmacológicos actuales o complementarios.

[0206] Todos los sujetos se mantuvieron en ayunas desde la noche antes del examen. Los sujetos fueron evaluados para el poder antioxidante de la saliva al menos una hora después de los procedimientos de higiene autónomos normales (cepillado de los dientes con pasta de dientes) y antes de ser sometidos a ninguna otra revisión dental. La saliva se recogió a una temperatura de 25 °C de sujetos sentados cómodamente de acuerdo con la metodología indicada en el Ejemplo 2.

[0207] Si el volumen no alcanzaba la cantidad requerida de 1 a 1,5 ml, se repite la recogida de la saliva después de un descanso de al menos 10 minutos.

[0208] Los valores medios y parámetros de dispersión se calcularon sobre los datos; además, para mostrar claramente las diferencias entre los grupos, se aplicó la prueba t de Student. Además, se determinó el coeficiente de correlación entre los resultados del método de la invención y la gravedad de la paradontosis.

[0209] Las características generales de los sujetos se muestran a continuación:

Variables	Sujetos sanos	Sujetos con paradontosis	Prueba t
Género	25 H; 25 M	23 H; 27 M	
Años	39 ± 9,5	32 ± 8,3	p <0,05
Patología concomitante			
Hipertensión y/o dislipidemia	0	16	
Artrosis	0	6	
Diabetes de tipo II	0	8	

[0210] Se observó que los sujetos afectados por paradontosis son significativamente más jóvenes que los sujetos sanos.

[0211] Las evaluaciones de los valores del poder antioxidantes salivales, el flujo de saliva relativa y el grado de paradontosis se dan en la Tabla 13.

Tabla 13. Comparación entre sujetos sanos y sujetos afectados por paradontosis. Valores medios ± DE.

Variables	Sujetos sanos	Sujetos con paradontosis	Prueba t
Índice de paradontosis	0	2,1 ± 0,92	
Volumen (ml/min)	1,21 ± 0,17	1,17 ± 0,15	ns
Método de la invención (µmol/l)	2032 ± 332,1	1212 ± 220,6	p <0,05

[0212] Se encontró que, aunque los flujos de saliva en realidad no diferían significativamente entre los sujetos afectados por paradontosis, el ensayo de flujo de saliva a menudo se debía repetir para estos últimos debido a la producción escasa.

[0213] En vista de la importante diferencia de edades entre los dos grupos, el análisis estadístico se corrigió para la edad, pero, sin embargo, se encontraron diferencias significativas en los valores de flujo de saliva, ya que indicaban que en sujetos afectados por paradontosis se reducía el poder antioxidante de la saliva.

[0214] Por otra parte, se observó una correlación inversamente proporcional entre la gravedad de la paradontosis y los valores del poder antioxidante de la saliva relativa ("r" - 0,544 p <0,05). Esto confirmó la evidencia experimental, como se muestra y se ha comentada anteriormente con referencia a la Tabla 3.

Ejemplo 8. Evaluación del poder antioxidante de ciertos alimentos y bebidas de acuerdo con el método de la invención

[0215] Se utilizó el método de la invención para determinar el poder antioxidante de una serie de alimentos y bebidas que pueden contener diferentes cantidades de fosfatos.

[0216] Para cada producto, se examinaron 5 lotes de diferente origen y las evaluaciones se llevaron a cabo para todas las muestras en el mismo día de la recogida y después de manera simultánea en los días posteriores.

[0217] Los resultados se dan en la Tabla 14.

Tabla 14. Determinaciones del poder antioxidante de bebidas y alimentos

Producto	Método de la invención (µmol/l)	Porción media (ml o g)	Porción total (µmol equiv. de vitamina C)
Limones [a]	11373 ± 140,5	20	1137 ± 14,0
Naranjas [b]	2460 ± 273,4	120	1476 ± 164,1
Tomates [c]	1113 ± 11,9	150	835 ± 8,9
Arándanos [d]	1318 ± 66,1	40	264 ± 13,2
Frambuesas [e]	4556 ± 100,0	40	911 ± 20,0
Vino Chianti [f]	5426 ± 81,9	120	651 ± 81,9
Vino Soave [g]	4711 ± 93,4	120	565 ± 11.2
Vino rosado [h]	5645 ± 200,5	120	677 ± 24,1
Vino de Oporto [i]	4536 ± 56,0	40	181 ± 2,2
Cerveza [l]	1408 ± 47,3	330	465 ± 15,6
Grappa [m]	162 ± 18,5	40	6 ± 0,7
Brandy [n]	312 ± 38,1	40	12 ± 1,5
Café [o]	7945 ± 185,9	30	1192 ± 27,9
Té [p]	3840 ± 114,1	150	576 ± 17,1

[a] Limones Verdello [Tipo: Scelgobio® - Origen Italia, Cat. II Código de calibre 4/5]
[b] Naranjas de sangre [Tipo: Mariarosa - Origen Italia, Cat. I Código de calibre 6]
[c] Tomates para la fabricación de pasta [origen: Italia]
[d] Arándanos [Tipo: Vitalberry- Origen Chile, Cat. I]
[e] Frambuesas [Tipo: Natberry Maroc - Origen Marruecos, Cat. I]
[f] Chianti Classico [Productor: Cecchi - Origen Italia]

[g] Soave Cadis [Productor: Cantina di Soave - Origen Italia]
[h] Rosado de Salento [Productor: Al Tralcio Antico - Origen Italia]
[i] Oporto Tawny [Productor: Offley - Origen Portugal]
[l] Dreher [Productor: Dreher - Origen Italia]
[m] Pinot Nero Grappa [Productor: La Versa - Origen Italia]
[n] Fundador [Productor: Pedro Domecq - Origen España]
[o] Nespresso [Tipo: Roma - Origen Italia]
[p] Twinings® [Tipo: Earl Grey - Origen Reino Unido]

[0218] El café, preparado con una máquina automática de Nespresso, era de una calidad tipo Caffe' Roma. Se prepararon 5 cafés diferentes en una cantidad de 30 ml.
En relación con el té, se utilizaron bolsas de té Twinings® [Earl Grey clásico]; las muestras se prepararon mediante la infusión de una bolsa de té durante 3 minutos en 150 ml de agua que se utilizó 2 minutos después de que hubiese bullido.
La fruta y los tomates, representativas de cualquier frutas y hortalizas, se homogeneizaron y se diluyeron con agua desionizada en una proporción de 1:5. Todas las muestras se centrifugaron a 800 rpm durante 2 minutos y la determinación se llevó a cabo en 10 µl de sobrenadante.
En caso de que la determinación hubiese superado los 6000 µmol/l (por ejemplo, para el café y el limón), la medición se repitió usando 5 µl y el valor se multiplica por 2.
La Tabla 14 también muestra los valores del poder antioxidante total de las porciones de alimentos. Sorprendentemente, de estos datos se deduce que los valores antioxidantes de un vino blanco (Soave) y un vino rosado (Salento) no son significativamente diferentes de las del vino tinto (Chianti). Entre los alimentos analizados, las naranjas, los limones y el café son los que tienen el poder antioxidante más alto.

[0219] De la descripción detallada y los ejemplos proporcionados más arriba, son evidentes las ventajas conseguidas por medio del reactivo y el método de la presente invención. En particular, dicho reactivo permite enmascarar la presencia de fosfatos en muestras de fluidos biológicos y vegetales, evitando así ventajosamente que dichos fosfatos interfieran con la determinación del poder antioxidante, mientras que al mismo tiempo los mantiene en solución, es decir, evitando su precipitación que desventajosamente incurriría en una etapa de separación dedicada. Dichas ventajas son particularmente apreciadas en términos de viabilidad y rentabilidad de la aplicación del método. Dicho método de la invención, también en virtud del kit que comprende dicho reactivo, permite evaluar el poder antioxidante en fluidos biológicos y vegetales de una manera fiable, reproducible y repetible y económicamente conveniente, superando así las desventajas anteriormente mencionadas de los métodos conocidos, y, en particular, las desventajas observadas en relación con el ensayo de BAP.

Referencias bibliográficas

[0220]

1) Percival RS, Challacombe SJ, Marsh PD. Flow rates of resting whole and stimulated parotid saliva in relation to age and gender. J Dent Res. 1994; 73:1416-1420.
2) Del Vigna de Almeda P, Trindade Grècio A, Naval Machado A et al. Saliva composition and functions: a comprehensive review. J Cont Dent Pract. 2008; 9:1-11.
3) Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. J Prost Den 2001; 85:162-169.
4) Battino M, Ferreiro MS, Gallardo I et al. The antioxidant capacity of saliva. J Clin Periodontol 2002; 29:189-194.
5) Moore S, K AC Calder, Miller NJ, C A Rice-Evans. Antioxidant activity of saliva and periodontal disease. Free Rad Res 1994; 21:417-425.
6) Meyle J, Kapitza K. Assay of ascorbic acid in human crevicular fluid from clinically healthy gingival sites by high-performance liquid chromatography. Arch Oral Biol 1990; 35:319-323.
7) Nagler RM, Klein I, Zarhevsky N et al. Characterization of the differentiated antioxidant profile in human saliva. Free Rad Biol Med 2002; 32:268-277.
8) Iwamoto Y, Nakamura R, Watanabe T, Tsunemitsu A. Heterogenity of peroxidase related to antibacterial activity in human parotid saliva. J Dent Res 1972; 51:503-508.
9) Thomas EL, Milligan TW, Joyner RE, Jefferson MM. Antibacterial activity of hydrogen peroxide and the lactoperoxidase-hydrogen peroxide-thiocyanate system against oral streptococci. Infect Immun 1994; 62:529-535.
10) Grisham MB, Ryan EM. Cytotoxic properties of salivary gland. Am J Physiol 1990; 258:$C_1$15-$C_1$21.
11) Kou F, Takahama U. Hydrogen peroxide-induced luminescence and evolution of molecular oxygen saliva. Arch Oral Biol 1995; 40:15-21.
12) Borges I, Machado-Moreira EA, Filho DW et al. Proinflammatory and oxidative stress markers in patients with periodontal disease. Med Inflamm 2007; ID 45794:1-5
13) Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. Agr Food Chem 2005; 53:1841-1856.

14) Magalhães LM, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. Anal Acta 2008; 613:1-19.
15) Hirayama O, Tagaki M, Hukumoto K, Katoh S. Evaluation of antioxidant activity by chemiluminescence. Anal Biochem 1997; 247:237-241.
16) Hirayama O, Yida M. Evaluation of hydroxyl radical-scavenging ability by chemiluminescence. Anal Biochem 1997; 251:297-299.
17) Kohen R, Beit-Yannai E, Berry EM, Tirosh O. Overall low molecular weight antioxidant activity of biological fluids and tissues by cyclic voltammetry. Method Enzymol 1999; 300:285-296.
18) Celi P, Sullivan M, Evans D. The stability of the reactive oxygen metabolites (d-ROMs) and biological antioxidant potential (BAP) tests on stored horse blood, Vet J 2010; 183:217-218.
19) Dick WA, Tabatabai MA. Determination of Orthophosphates in aqueous solutions containing labile organic and inorganic phosphorus compounds. J Environ Qual 1977; 6:82-85.
20) He Z, Griffin T, Honeycutt CW. Phosphorus distribution in dairy manures. J Environ Qual 2004; 33:1528-1534.
21) Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. Anal Biochem 1996; 239:70-76.
22) Composizione degli alimenti- Aggiornamento 2000 Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione Ed EDRA Medical Publishing & New Media.

REIVINDICACIONES

1. Un uso de un reactivo que comprende al menos una sal inorgánica de circonio y al menos un disolvente, dicho al menos un disolvente que es una mezcla de agua y un alcohol lineal o ramificado (C_1-C_5), para la determinación del poder antioxidante de fluidos biológicos y vegetales.

2. El uso de la reivindicación 1, en el que la sal inorgánica de circonio se selecciona del grupo que consiste en fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro, carbonato, sulfato, nitrato y mezclas de los mismos.

3. El uso de la reivindicación 2, en el que la sal inorgánica de circonio se selecciona del grupo que consiste en fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro y mezclas de los mismos.

4. El uso de la reivindicación 3, en el que dicha sal inorgánica de circonio es $ZrCl_4$.

5. Un método para determinar el poder antioxidante de fluidos biológicos y vegetales, que comprende las etapas de:

a) proporcionar una solución alcohólica de tiocianato;
b) añadir al menos un reactivo que comprende al menos una sal inorgánica de circonio y al menos un disolvente, dicho al menos un disolvente que es una mezcla de agua y un alcohol lineal o ramificado (C_1-C_5),
c) añadir una solución de sal férrica acuosa;
d) medir la absorbancia de la solución así obtenida;
e) añadir la muestra de fluido biológico o vegetal;
f) medir la absorbancia de la solución que contiene la muestra;
g) restar la absorbancia en la etapa d) de la absorbancia en la etapa f); y
h) dibujar el valor de absorbancia obtenido de este modo en la curva de calibración convencional de la vitamina C y obtener un valor para el poder antioxidante del fluido a examen como equivalentes de vitamina C, de acuerdo con la ley de Lambert-Beer.

6. El método de la reivindicación 5, en el que dicha sal férrica se selecciona del grupo que consiste en fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro, carbonato, sulfato y nitrato.

7. El método de la reivindicación 6, en el que dicha sal férrica es nitrato.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en el que la sal inorgánica de circonio del reactivo b) y dicha sal férrica están en una relación molar de 20:1 a 5:1.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5-8, en el que dicha muestra de fluido biológico o vegetal y la solución obtenida después de la etapa c) están en una relación volumétrica de 1:250 a 1:50.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5-9, en el que dicho fluido biológico o vegetal es saliva, suero, plasma, orina, lágrimas, sudor, fluido derivado de fruta, verduras, comida, vino, cerveza, bebidas, café o té.

11. Un kit para la realización del método de la reivindicación 5, que comprende:

i) al menos un reactivo que comprende al menos una sal inorgánica de circonio y al menos un disolvente, dicho al menos un disolvente que es una mezcla de agua y alcohol lineal o ramificado (C_1-C_5);
ii) al menos una solución alcohólica de tiocianato;
iii) al menos una solución acuosa de sal férrica; y
iv) un folleto ilustrado que comprende instrucciones para llevar a cabo la determinación del poder antioxidante.

12. El kit de la reivindicación 11, en el que dicho i) al menos un reactivo y dicho ii) al menos una solución alcohólica de tiocianato son una sola solución.

13. El kit de la reivindicación 11 o 12, en el que dicho folleto ilustrativo comprende además instrucciones para la recogida de la muestra de fluido biológico o vegetal.

14. El kit de la reivindicación 13, en el que cuando dicho fluido biológico es saliva, dichas instrucciones adicionales para la recogida de muestras indican que dicha recogida se lleva a cabo en condiciones de flujo de saliva de 0,70 a 1,50 ml/min.