

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 696 228**

21 Número de solicitud: 201830505

51 Int. Cl.:

**G01N 21/25** (2006.01)

**G01J 3/46** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**25.05.2018**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**14.01.2019**

71 Solicitantes:

**BIOQUOCHEM SL (100.0%)**  
**Edificio CEEI, Parque Tecnológico de Asturias**  
**33428 Llanera (Asturias) ES**

72 Inventor/es:

**HEVIA SÁNCHEZ, David;**  
**MUÑOZ CIMADEVILLA, Henar y**  
**GÓMEZ LÓPEZ, Esther**

54 Título: **MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL EN MUESTRAS LÍQUIDAS MEDIANTE UN DISPOSITIVO MÓVIL**

57 Resumen:

El método objeto de la invención comprende la utilización de varias reacciones químicas basadas en la neutralización de sustancias oxidantes por la muestra, y se basan en la presencia de un marcador colorimétrico cuya intensidad aumenta o disminuye en función del potencial de oxidación y concentración de los antioxidantes presentes. El objeto de la presente invención consiste en un sistema que permita medir la intensidad de color con la cámara de un dispositivo inteligente a tiempo real, sin necesidad de realizar una fotografía, extrayendo el valor representativo de color y, que el propio sistema, mediante una serie de calibraciones previamente introducidas en él, devuelva un valor representativo de la capacidad antioxidante total de la muestra, como una ponderación de los resultados de los diferentes ensayos individuales que evalúan la capacidad antioxidante total, permitiendo así la comparación del resultado entre muestras líquidas a través de una escala de valor.

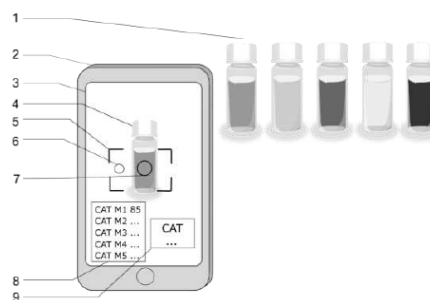


FIG.1

**DESCRIPCIÓN**

**MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE  
TOTAL EN MUESTRAS LÍQUIDAS MEDIANTE UN DISPOSITIVO MÓVIL**

5

**SECTOR DE LA TÉCNICA**

10 La presente patente se encuentra enmarcada dentro de los métodos analíticos para la cuantificación de la capacidad antioxidante en muestras líquidas, con especial interés en bebidas como vino, zumos, cerveza, etc. mediante un dispositivo móvil.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

15 En química la oxidación de un compuesto se define como la pérdida de electrones, de hidrógenos o la ganancia de oxígeno y, por el contrario, la reducción de un compuesto como la ganancia de electrones, de hidrógenos o la pérdida de oxígeno. De este modo, un agente oxidante es una molécula que se reduce al reaccionar con la molécula a la cual oxida. Este par oxido-reductor es necesario químicamente y esencial para entender  
20 la biología de las óxido-reducciones en el organismo.

Los oxidantes son compuestos electrofílicos que tienen afección por los electrones y que tienen afinidad para reaccionar con macromoléculas nucleofílicas, como las proteínas los ácidos nucleicos o los lípidos, todas ellas fundamentales para la vida.

25 La mayoría de las células y organismos de nuestro planeta se enfrentan a ambientes con agresores oxidativos. El hecho de que nuestro organismo utilice el oxígeno como la molécula oxidante final del metabolismo aeróbico hace que las células mantengan una alta concentración de productos oxidantes del metabolismo, especies reactivas de oxígeno y radicales libres. Es por ello por lo que las células necesitan de un sistema amortiguador reductor para limitar el daño causado por estos productos del metabolismo  
30 oxidativo. Aparte de los mecanismos amortiguadores endógenos como las macromoléculas que acomplejan especies reactivas, los antioxidantes endógenos u otros enzimas, el organismo puede adquirir antioxidantes de manera exógena. Los antioxidantes exógenos son antioxidantes que provienen de la dieta, principalmente de los productos vegetales, que poseen una gran variedad de compuestos naturales  
35 antioxidantes, como la vitamina E ( $\alpha$ - tocoferol), la vitamina C (ácido ascórbico), el  $\beta$ -caroteno (provitamina A), los polifenoles, los licopenos, los ácidos egálicos, los flavonoides, las catequinas o los taninos, entre otros.

Es por lo tanto de utilidad evaluar la capacidad reductora de dichos compuestos formando parte de un fluido biológico o una bebida, cada uno de ellos presente en diferentes proporciones. Por este motivo, la medición de los antioxidantes individuales por separado no permite conocer con certeza la capacidad antioxidante total de una  
5 preparación, compuesto o de un fluido biológico, ya que pueden establecerse efectos sinérgicos entre los distintos antioxidantes presentes en él.

Los métodos existentes en la actualidad para determinar la capacidad antioxidante total consisten en medir la actividad antioxidante de una muestra mediante reacciones de oxido-reducción; como por ejemplo TEAC (del inglés, *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), TRAP (*Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter*), FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*), DPPH (*2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl*) o Folin-Ciocalteu.  
10

Existen, además, varias patentes relacionadas con la medición de la capacidad antioxidante total de una muestra como son:

15

- La patente US20110256248, que está basada en un nuevo método para medir la actividad antioxidante mediante la captación de oxígeno y la disolución de la muestra problema en un solvente con detergente a concentraciones no saturantes. Proporciona, además, una composición antioxidante con actividad  
20 antioxidante sinérgica.
- La patente WO2010045986 describe un método para medir la resistividad oxidativa de una muestra mediante la adición de un reactivo oxidante midiendo la capacidad antioxidante residual total tras un tiempo de reacción mediante la utilización de un marcador quimioluminescente.

25

La utilización de estos métodos para cuantificar la capacidad antioxidante de una muestra requiere de la utilización de una sustancia patrón para realizar un calibrado con concentraciones conocidas del mismo. Esto hace que los diferentes ensayos que existen en la actualidad no sean comparables entre sí, ya que están basados en distintos  
30 mecanismos de actuación y utilizan moléculas patrón diferentes. Es por ello por lo que el objetivo de esta patente es establecer una escala universal que permita establecer un valor único de medida de la capacidad antioxidante total de una muestra. Asimismo, los métodos descritos en las mencionadas patentes, así como los descritos en la bibliografía requieren el uso de equipos espectrofotométricos o fluorimétricos para cuantificar la  
35 inhibición de estos radicales por los compuestos antioxidantes de la muestra, que es detectada mediante una reacción colorimétrica o fluorimétrica. Los inconvenientes principales del uso de estos equipos son su alto coste y su no-portabilidad. Por esta

razón, esta patente describe un método para cuantificar la capacidad antioxidante de una muestra mediante un dispositivo móvil, lo cual permite desplazar este tipo de ensayos al lugar de necesidad (*point-of-care*).

En este sentido existen otras patentes que describen la posibilidad cuantificar una  
5 reacción química mediante la toma de una fotografía con un dispositivo móvil:

- La patente ES2555161A1 describe un procedimiento de medida de medida de la concentración de especies químicas de interés industrial, medioambiental o biomédico a través del procesado de los valores RGB de una fotografía digital  
10 tomada conjuntamente a un sensor colorimétrico y a un sistema de patrones de referencia.
- La patente US9506855B2 describe un método, sistema y programa informático para analizar un ensayo colorimétrico que incluye la obtención de una imagen del ensayo, la corrección opcional de la luz ambiental y convertir los datos de  
15 intensidad de al menos uno de los canales RGB mediante su comparación con una curva standard.

Estas patentes describen la posibilidad de cuantificar átomos, moléculas, iones o radicales presentes en una muestra mediante la realización de una fotografía y la  
20 extracción de los valores RGB de una reacción colorimétrica. El procedimiento descrito en este documento, sin embargo, posibilitaría la cuantificación una capacidad u actividad, concretamente la capacidad antioxidante total de una muestra pura o mixta con diferentes proporciones de compuestos antioxidantes, cuantificándose así los posibles efectos sinérgicos. Mediante la extracción del valor de color a tiempo real a  
25 través de la cámara digital integrada de un dispositivo móvil, se obtendrían los valores de capacidad antioxidante total de varios métodos como pueden ser, de forma ilustrativa y no limitativa, ABTS, TEAC, DPPH, FRAP, y Folin-Ciocalteu, todos ellos ensayos colorimétricos, cuyos resultados serían ponderados en un único valor que definiría la capacidad antioxidante total de una muestra y permitiría comparar este valor entre  
30 muestras problema de todo tipo.

## **EXPLICACIÓN DE LA INVENCION**

Con el fin de evitar los inconvenientes de otros métodos de medición de la capacidad  
35 antioxidante, tal y como se ha mencionado anteriormente, se propone un método capaz de obtener resultados fiables y rápidos en muestras líquidas de diversos orígenes, con especial interés en bebidas.

El método objeto de la invención comprende la utilización de varias reacciones químicas basadas en la neutralización de sustancias oxidantes por la muestra, y se basan en la presencia de un marcador colorimétrico cuya intensidad aumenta o disminuye en función del potencial de oxidación y concentración de los antioxidantes presentes, es decir, capacidad antioxidante de la muestra problema. El objeto de la presente invención consiste en un sistema que permita medir esa intensidad de color con la cámara de un dispositivo inteligente a tiempo real, sin necesidad de realizar una fotografía, extrayendo el valor representativo de color (en la escala de color RGB, con carácter ilustrativo y no limitativo) y, que el propio sistema, mediante una serie de calibraciones previamente introducidas en él, devuelva un valor representativo de la capacidad antioxidante total de la muestra, como una ponderación de los resultados de los diferentes ensayos individuales que evalúan la capacidad antioxidante total, permitiendo así la comparación del resultado entre muestras de todo tipo, universalizando el concepto de capacidad antioxidante a través de una escala de valores.

La extracción del valor de color de la reacción química se llevaría a cabo, junto con el balance de blancos, a tiempo real, sin necesidad de tomar una fotografía, utilizando la cámara de un dispositivo inteligente. A modo ilustrativo y no limitativo, del valor RGB, comprendidos entre 0 y 255 para cada parámetro de color, en este caso: R (*Red* del inglés, rojo), G (*Green* del inglés, verde) y B (*Blue* del inglés, azul), se utilizarían únicamente los que mostrasen una mejor correlación con los valores de concentración conocidos del standard de cada método. Los métodos para evaluar la capacidad antioxidante pueden ser, de forma ilustrativa pero no limitativa, ABTS, TEAC, DPPH, FRAP, y Folin-Ciocalteu.

El calibrado de cada método, que relaciona los valores de color con los valores de concentración de un standard, estaría ya programado en el sistema con lo que el usuario no necesitaría más que extraer el valor de color de la reacción química con la muestra problema. A modo de ejemplo, para el ensayo Folin-Ciocalteu, el sistema extraería la componente G del valor RGB de color para interpolar el valor de capacidad antioxidante de la muestra problema, ya que el sistema estaría así configurado porque es esta componente de RGB la que mejor ajuste obtiene al realizar el calibrado con concentraciones conocidas de standard.

Posteriormente, se obtendrían mediante un algoritmo matemático un valor ponderado de la capacidad antioxidante total, comprendido en una escala del 0 al 100, que

integrase los diferentes métodos para una valoración más completa de la misma, proporcionando la posibilidad de comparar de forma más precisa la capacidad antioxidante de diferentes muestras líquidas, con especial interés, pero sin ser limitativo, en bebidas de origen natural como vinos, zumos, sidra, cerveza, etc.

5

Las ventajas principales de esta invención se resumen como sigue:

10

- El método objeto de la invención permite la determinación de la capacidad antioxidante en diferentes tipos de muestras líquidas mediante un dispositivo móvil.

15

- El método objeto de la invención realiza mediciones de forma rápida, en menos de un minuto y a tiempo real.
- El método objeto de la invención se puede integrar en cualquier dispositivo inteligente que disponga de una cámara para la determinación del color de la disolución, permitiendo su uso en el lugar de necesidad (*point-of-care*).

20

- El método objeto de la invención es capaz de integrar los valores de la capacidad antioxidante obtenidos mediante cinco métodos diferentes, en una escala que los correlacione y, por tanto, permita la obtención de un valor de capacidad antioxidante total más completo y representativo que pueda ser comparado entre muestras de diferente tipo a través de una escala.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

30

Figura 1.- Muestra una vista del dispositivo móvil, con cámara fotográfica integrada, en el momento de extracción de los valores de color de la reacción química colorimétrica para evaluar la capacidad antioxidante utilizando cinco métodos distintos como pueden ser, a modo ilustrativo y no limitativo ABTS, TEAC, DPPH, FRAP, y Folin-Ciocalteu, sin necesidad de tomar una fotografía, a tiempo real mediante un sistema que interpola los

35

valores de capacidad antioxidante total en una escala de 0 a 100, que pondera los valores de capacidad antioxidante total obtenido con los cinco métodos.

Figura 2.- Muestra las rectas de calibrado obtenidas mediante la representación de valores conocidos de capacidad antioxidante total a partir de unos de los métodos (expresado en equivalentes de una molécula patrón, en ug/ml) frente a los valores de RGB (comprendidos de 0 a 255).

5

Figura 3.- Muestra la ecuación que pondera los valores de capacidad antioxidante total obtenidos con cinco métodos, a modo ilustrativo pero no limitativo.  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$ ,  $M_4$  y  $M_5$  corresponden a los valores de capacidad antioxidante total obtenido con cada uno de los cinco métodos, escalados de 0 a 100. La simbología corresponde con los coeficientes, bases y exponentes de la ecuación.

10

A continuación, se proporciona una lista de los distintos elementos señalados en las figuras adjuntadas en este documento en la sección correspondiente de dibujos:

15 Figura 1:

1= Reacciones químicas obtenidas mediante cinco métodos diferentes para evaluar la capacidad antioxidante.

2= Dispositivo móvil con cámara fotográfica integrada.

3= Pantalla del dispositivo móvil.

20 4= Ensayo de capacidad antioxidante del cual se extrae el valor de color representativo de la intensidad de la reacción y al cual debe apuntar el dispositivo.

5= Área reservada por el sistema para que el usuario enfoque a la reacción química para evaluar la capacidad antioxidante total de una muestra y el sistema extraiga el valor de color de dicha reacción cuya intensidad de color es dependiente de la concentración y potencial de oxidación de los compuestos antioxidantes que contenga la muestra.

25

6= Área reservada por el sistema para que el usuario apunte a una zona de color blanco para realizar el balance de blancos a tiempo real.

7= Área reservada por el sistema para que el usuario apunte a la reacción química para evaluar la capacidad antioxidante total de la muestra y de ése área el sistema extraiga el valor representativo del color.

30

8= Valores de capacidad antioxidante total (CAT) obtenidos con los diferentes métodos ( $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$ ,  $M_4$ ,  $M_5$ ), relativizados en una escala comprendida de 0 a 100.

9= Valor de capacidad antioxidante total (CAT) ponderada a partir de los valores obtenidos con los cinco métodos expresado en una escala comprendida de 0 a 100.

35

**REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION**

La invención se refiere a un método para la medida directa de la capacidad antioxidante total o TAC (del inglés, *Total Antioxidant Capacity*) de una muestra líquida mediante un dispositivo inteligente con cámara integrada, el cual comprende las siguientes etapas:

- 5                   • Poner en contacto la muestra con una solución de una sustancia susceptible de ser reducida por los antioxidantes presentes en la muestra que, en dicho caso, da lugar a un cambio de color mediante la utilización de una molécula susceptible de cambiar de color con las reacciones de oxido-reducción.
- 10                  • Medir el color final de la reacción química mediante un dispositivo con cámara integrada, que extrae un valor representativo del color mediante las escalas disponibles, como pueden ser a modo ilustrativo y no limitativo RGB, CMYK, HSV o Lab.
- 15                  • Comparar e interpolar los valores obtenidos de color a partir de la ecuación previamente integrada en el sistema para calcular la capacidad antioxidante de dicha muestra acorde con el método que ha sido utilizado para la valoración. A modo ilustrativo pero no limitativo, en caso de utilizar la escala de color RGB, el sistema extraería la componente que mejor correlación muestre con los valores de capacidad antioxidante total analizados con cada método. El sistema estará programado con las rectas de calibrado, resultado de representar valores de capacidad antioxidante conocidos (utilizando un patrón) frente a la componente que mejor ajuste muestre del valor RGB, para cada uno de los métodos que analiza la capacidad antioxidante de una muestra, como son a modo ilustrativo pero no limitativo, ABTS, TEAC, DPPH, FRAP, y Folin-Ciocalteu.
- 20                  • Convertir el resultado de capacidad antioxidante medida para cada uno de los métodos, en valores comprendidos en una escala del 0 al 100, en la que 0 es el valor más bajo y 100 el valor más alto posible.
- 25                  • Este proceso se repite para los cinco métodos considerados para la medición de la capacidad antioxidante, que son de forma ilustrativa pero no limitativa, ABTS, TEAC, DPPH, FRAP, y Folin-Ciocalteu.
- 30                  • Realizar una ponderación final de los valores mediante la utilización de una fórmula matemática, para obtener un valor en un rango del 0 al 100 de capacidad antioxidante total final equiparable para diferentes tipos de muestra.

35



**REIVINDICACIONES**

1. Un método para la determinación de la capacidad/actividad antioxidante o capacidad reductora en muestras líquidas mediante un dispositivo móvil, que comprende los siguientes pasos:
- 5
- Poner en contacto la muestra con una solución de una sustancia susceptible de ser reducida por los antioxidantes presentes en la muestra que, en dicho caso, da lugar a un cambio de color mediante la utilización de una molécula susceptible de cambiar de color con las reacciones de oxido-reducción. Realizar este paso con al menos dos ensayos, de la capacidad antioxidante que son, a modo ilustrativo, pero no limitativo, ABTS, DMPD, DPPH, FRAP y Folin-Ciocalteu.
  - 10
  - Extraer al menos un valor de color de la reacción colorimétrica obtenida con al menos dos ensayos, mediante un dispositivo móvil con cámara y un algoritmo para la extracción del valor de color y para realizar el balance de blancos.
  - 15
  - Obtener el valor único de capacidad antioxidante total de la muestra problema mediante el dispositivo móvil, ya calibrado con las ecuaciones que representan la relación entre la variable “valor de color” y la variable “capacidad antioxidante total”, para cada uno de los cinco métodos; así como la ecuación que pondera los valores de capacidad antioxidante total de los cinco métodos en un valor único de capacidad antioxidante total.
  - 20
2. El método según la reivindicación 1, caracterizado por utilizar cualquiera de las combinaciones de ensayos colorimétricos de la capacidad antioxidante para la obtención de un valor final.
- 25
3. El método según la reivindicación 1, caracterizado por extraer el valor representativo del color en la escala RGB, a modo ilustrativo pero no limitativo.
- 30
4. El método según la reivindicación 1, caracterizado por utilizar cualquier dispositivo móvil o inteligente que disponga de una cámara para poder extraer los valores de color a tiempo real.
5. El método según la reivindicación 1, caracterizado por utilizar cualquier dispositivo móvil o inteligente que disponga de cualquier tipo de sensor de imagen como CCD o CMOS, a modo ilustrativo pero no limitativo.
- 35
6. El método según la reivindicación 1, caracterizado por utilizar cualquier dispositivo móvil o inteligente que disponga de una cámara para poder extraer

los valores de color mediante la toma de una fotografía.

7. El método según cualquiera de las anteriormente mencionadas reivindicaciones por el cual se determine la concentración de una única sustancia antioxidante como puede ser, a modo ilustrativo y no limitativo, ácido ascórbico o ácido úrico.
- 5 8. El método según la reivindicación 1 aplicado a cualquier otra sustancia líquida de origen biológico como puede ser, a modo ilustrativo y no limitativo, sangre, plasma, saliva, orina y tejidos húmedos.
9. El método según la reivindicación 1 aplicado a cualquier otra muestra de origen sólido que haya sido extraída en fase líquida.
- 10 10. El método según la reivindicación 1 que utilice cualquier tipo de reacción de óxido-reducción para la determinación de la capacidad antioxidante en la muestra.
11. El método según la reivindicación 1 mediante el cual se ponga en contacto la muestra con una solución de una sustancia susceptible de ser reducida por los antioxidantes presentes en la muestra que, en dicho caso, da lugar a una emisión de fluorescencia mediante la utilización de una molécula susceptible de cambiar los niveles de fluorescencia con las reacciones de oxido-reducción.
- 15

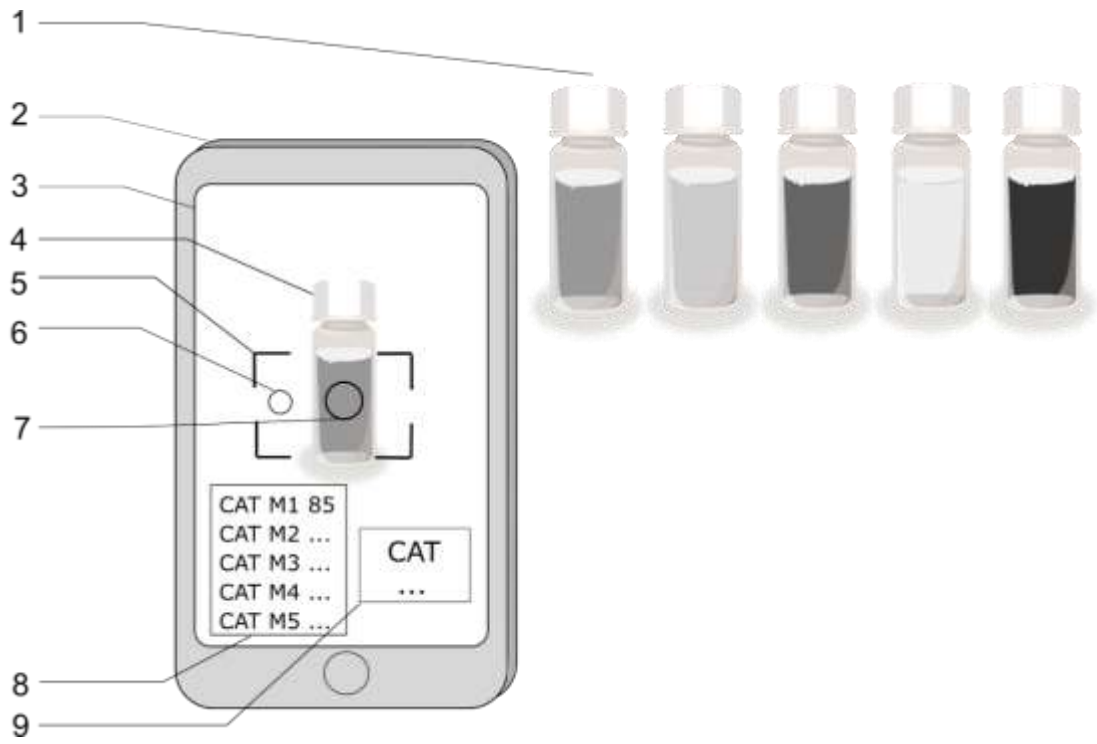


FIG.1

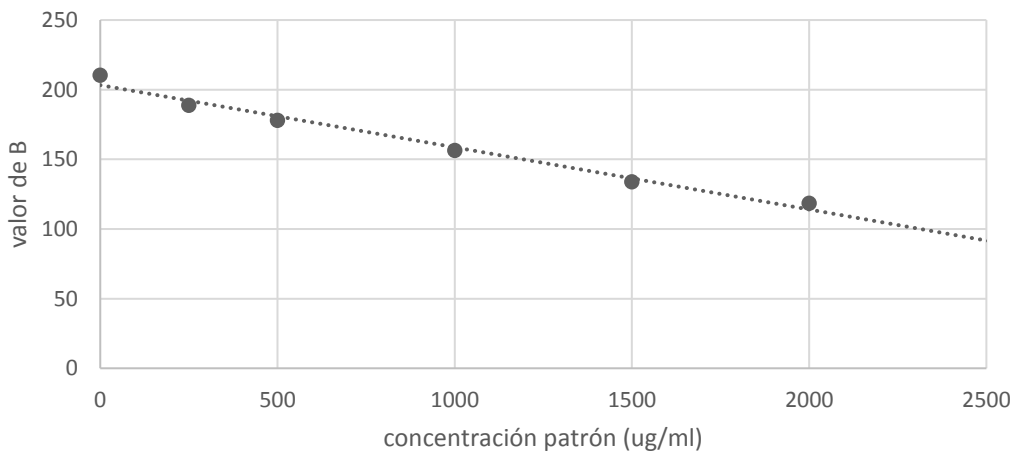
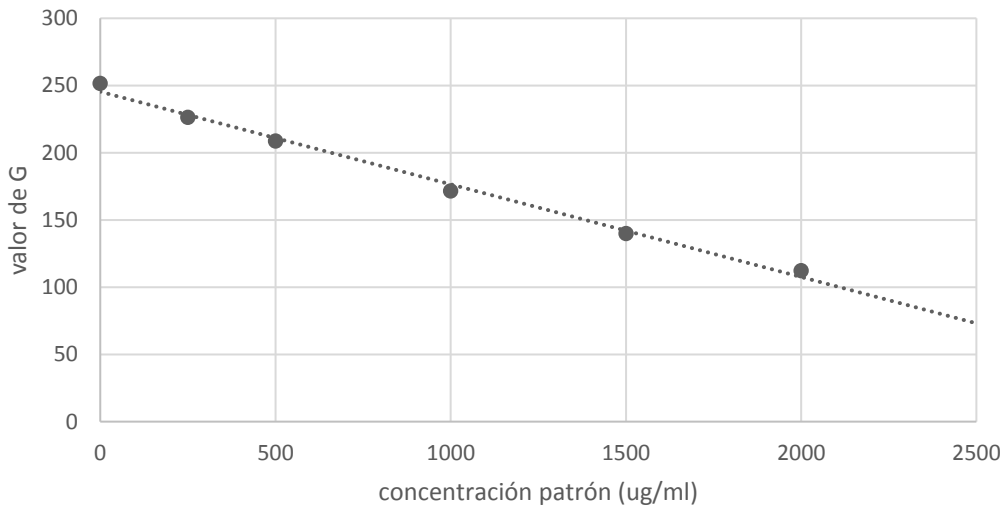
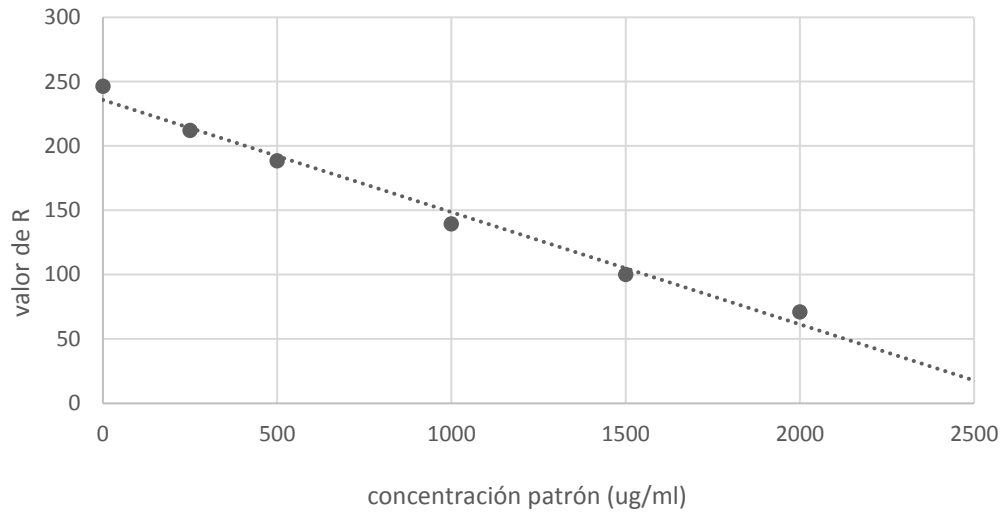


FIG. 2

$$\text{Capacidad Antioxidante} = \frac{K_1 \cdot M_1^a}{b^c} + \frac{K_2 \cdot M_2^d}{e^f} + \frac{K_3 \cdot M_3^g}{h^i} + \frac{K_3 \cdot M_4^j}{k^l} + \frac{K_3 \cdot M_5^m}{n^o}$$

FIG.3



- ②① N.º solicitud: 201830505  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 25.05.2018  
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N21/25** (2006.01)  
**G01J3/46** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ES 2555161 A1 (UNIVERSIDAD DE BURGOS) 29/12/2015, página 6, línea 7 – página 8, línea 10; página 19, línea 7 – página 21, línea 12; Figs. 1-6.	1-11
X	US 2015055134 A1 (PAPAUTSKY et al.) 26/02/2015, página 2, párrafos [0028]-[0035]; reivindicación 1; Figs. 1, 2.	1-11
X	GARCÍA A. <i>et al.</i> Mobile phone platform as portable chemical analyzer. Sensors and Actuators B, 2011, Vol. 156, pp: 350-359, abstract.	1-11
A	KUSKOSKI EM. <i>et al.</i> APLICACIÓN DE DIVERSOS MÉTODOS QUÍMICOS PARA DETERMINAR ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN PULPA DE FRUTOS. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, 2005, Vol. 25, Nº 4, Pp: 726-732, resumen.	1-11

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  
28.12.2018

Examinador  
M. D. García Grávalos

Página  
1/2

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

G01N, G01J

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, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, GOOGLE PATENTS.