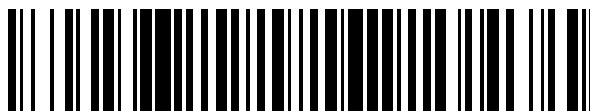


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 722 148**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/22** (2006.01)

**A23P 10/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.03.2005 PCT/US2005/006924**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.09.2006 WO06096161**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.03.2005 E 05724464 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019 EP 1858489**

54 Título: **Procedimientos y composiciones para la liberación modificada de complementos nutricionales**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.08.2019**

73 Titular/es:

**MANNATECH, INC. (100.0%)  
Suite 200, 600 South Royal Lane  
Coppell, TX 75019, US**

72 Inventor/es:

**MCANALLEY, BILL, H.;  
VENNUM, EILEEN;  
MCANALLEY, SHAYNE, A.;  
KOEPE, C., MICHAEL y  
EDWARDS, JOSH**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 722 148 T3

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

Procedimientos y composiciones para la liberación modificada de complementos nutricionales

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general al campo de la liberación modificada de complementos nutricionales y, más en particular, a composiciones, formulaciones y procedimientos para proporcionar complementación nutricional que se parezca más estrechamente a la de los alimentos durante su digestión.

### Antecedentes de la invención

Sin limitar el ámbito de la invención, sus antecedentes se describen en conexión con la tecnología de sensores antioxidantes y procedimientos para su detección.

10 Los sistemas biológicos han desarrollado sistemas antioxidantes para combatir los efectos de radicales y otras especies pro-oxidativas. Un antioxidante es cualquier sustancia que retrase o prevenga significativamente la oxidación de un sustrato oxidable cuando está presente en bajas concentraciones en comparación con las del sustrato oxidable. Hay enzimas que son antioxidantes, tal como el superóxido dismutasa y catalasa, que se codifican mediante muchos organismos. Las sustancias tales como la vitamina C y los fenoles vegetales son antioxidantes  
15 introducidos mediante la dieta en los sistemas biológicos. Se ha propuesto que los niveles de origen natural de estas sustancias no se producen de forma adecuada en el organismo o no se ingieren en la dieta normal. La dieta normal a menudo no proporciona suficientes antioxidantes puesto que es deficiente en frutas y verduras y/o las frutas y verduras que existen en la dieta están empobrecidas en antioxidantes debido a los procesamientos del mundo actual. La dieta normal podría mejorarse, sin embargo, la forma de vida actual y la pobre composición de los  
20 alimentos occidentales, hacen que los complementos sean el modo más práctico de proporcionar los antioxidantes requeridos por el organismo. Para complementar la dieta normal, es necesario determinar las capacidades de antioxidantes de los componentes incluidos en los complementos.

El documento WO 97/02829 A2 describe un procedimiento para prevenir y tratar la diarrea administrando entéricamente oligosacáridos indigestibles.

25 El documento WO 98/06418 A1 desvela composiciones gluconutricionales que comprenden carbohidratos vegetales para complementos dietéticos y apoyo nutricional.

El documento US 6 063 403 A desvela comprimidos de granulación en seco o gránulos que contienen desogestrel y un procedimiento de fabricación de tales comprimidos o gránulos.

30 El documento US 6 805 880 B1 desvela un sistema de suministro farmacéutico que comprende una formulación de liberación lenta de vitamina C y una formulación de liberación normal de vitamina E.

### Sumario de la invención

La presente invención incluye composiciones, procedimientos y formulaciones para la liberación modificada de cantidades nutricionalmente efectivas de, por ejemplo, antioxidantes, vitaminas, sacáridos, minerales, aminoácidos,  
35 ácidos nucleicos, mezclas y combinaciones de los mismos, en las que el complemento comprende una cantidad nutricionalmente efectiva de uno o más sacáridos que comprende uno o más polisacáridos de cadena larga y una cantidad nutricionalmente efectiva de uno o más de dichos complementos nutricionales, en el que el complemento dietético está comprimido a una presión superior a 100 psi, en el que los polisacáridos de cadena larga comprenden tanto un agente de liberación en tiempo para moléculas bioactivas como una porción del complemento dietético, en el que uno o más polisacáridos de cadena larga se aísla de goma tragacanto, goma guar, harina de cereal, extracto de árbol de alerce, extracto de aloe vera, goma gati, almidón, goma arábica, goma de xantano, sulfato de condroitina, polimanoosa acetilada y mezclas o combinaciones de los mismos; en el que uno o más de antioxidantes de  
40 complementos nutricionales comprende un desactivador de radical de oxígeno lipófilo aislado y purificado y un desactivador de radical de oxígeno lipófilo aislado y purificado, en el que el desactivador de radical de oxígeno lipófilo y lipófobo tienen un valor de desactivador de radical de oxígeno superior a 6.000  $\mu\text{Mol}$  de Equivalentes Trolox (ET)/gramo y en el que los polisacáridos de cadena larga que comprenden el agente de liberación en tiempo liberan el complemento nutricional después de que se haya digerido el complemento dietético. Se encontró que mediante el uso de condiciones idénticas: cápsula, pesos, etc., mediante el uso de nutrientes indicadores, por ejemplo, un antioxidante, la presente invención permitió la disolución con el tiempo del nutriente cuando se comprimó con polisacáridos de cadena larga. Ejemplos de polisacáridos de cadena larga, que también pueden formar parte del  
45 régimen de complementación nutricional, pueden tener subunidades monoméricas que tienen una longitud de, por ejemplo, de 2 a aproximadamente 50.000 monómeros de sacáridos y pueden comprimirse desde entre aproximadamente 100, 500, 1.000, 2.000 o incluso 10.000 psi o superior. A diferencia de la mayoría de complementos nutricionales en uso hoy en día, que se liberan inmediatamente, la presente invención permite una liberación más natural del uno o más antioxidantes, vitaminas, minerales, aminoácidos, ácidos nucleicos, sacáridos,  
50 mezclas y combinaciones de los mismos. A diferencia de los alimentos, la presente invención puede usarse para complementar deficiencias específicas en nutrientes esenciales de un modo que sea tanto científico, pero también

más natural.

El complemento puede colocarse dentro de una cápsula, una cápsula vegetal o una cápsula de gelatina dura. Cuando se comprime a una presión superior, por ejemplo, superior a 5.000 psi, se encontró que más del 85 % de los complementos nutricionales se liberan desde entre aproximadamente 1 a aproximadamente 8 horas y, en otras formulaciones de más del 85 % de los complementos nutricionales se liberan desde entre aproximadamente 2 a aproximadamente 6 horas. Los polisacáridos de cadena larga muchos incluyen monómeros seleccionados de galactosa, galactosamina, glucosamina, glucosa, manosa, manosa acetilada, ácido N-acetilneuramínico, fucosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, arabinosa, arabinogalactano, ácido galacturónico, ácido glucurónico, ácido idurónico, xilosa y mezclas o combinaciones de los mismos. El complemento puede comprimirse mediante compactación con rodillos a una presión de entre aproximadamente 2.000 a 10.000; 5.000 a 10.000; o superior a 10.000 psi. El uno o más polisacáridos de cadena larga pueden tener de entre aproximadamente el 0,1 a aproximadamente 75 por ciento en peso de, por ejemplo, galactosa, galactosamina, glucosamina, glucosa, manosa, manosa acetilada, ácido N-acetilneuramínico, fucosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, arabinosa, arabinogalactano, ácido galacturónico, ácido glucurónico, ácido idurónico, xilosa y mezclas o combinaciones de los mismos.

El complemento puede incluir uno o más polisacáridos de cadena larga seleccionados de galactosa, glucosa, manosa, ácido N-acetilneuramínico, fucosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina y xilosa, de, por ejemplo, goma tragacanto aislada y purificada, goma guar, harina de cereal, harina de arroz, caña de azúcar, azúcar de remolacha, patata, leche, agar, algina, goma de garrofín, psilio, goma karaya, gomas de semillas, extracto de árbol de alerce, extracto de aloe vera, goma gati, almidón, celulosa, celulosa degradada, fructosa, jarabe de maíz alto en fructosa, pectina, quitina, acacia, goma arábica, ácido alginico, carragenano, dextrano, goma de xantano, sulfato de condroitina, sacarosa, polimano acetilada, maltosa, glucano, lentinán, manano, levano, hemicelulosa, inulina, fructano, lactosa y mezclas o combinaciones de los mismos. En un ejemplo específico, los polisacáridos de cadena larga y/o la cantidad nutricionalmente efectiva de uno o más sacáridos incluye entre aproximadamente 1 a aproximadamente 10 por ciento en peso de cada uno de galactosa, galactosamina, glucosamina, glucosa, manosa, manosa acetilada, ácido N-acetilneuramínico, fucosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, arabinosa, arabinogalactano, ácido galacturónico, ácido glucurónico, ácido idurónico, xilosa aislados y purificados y mezclas o combinaciones de los mismos.

En otra realización de la presente divulgación, el complemento dietético de liberación modificada incluye uno o más de polisacáridos de cadena larga aislados y purificados seleccionados de goma tragacanto, goma guar, harina de cereal, harina de arroz, caña de azúcar, azúcar de remolacha, patata, leche, agar, algina, goma de garrofín, psilio, goma karaya, gomas de semillas, extracto de árbol de alerce, extracto de aloe vera, goma gati, almidón, celulosa, celulosa degradada, fructosa, jarabe de maíz alto en fructosa, pectina, quitina, acacia, goma arábica, ácido alginico, carragenano, dextrano, goma de xantano, sulfato de condroitina, sacarosa, polimano acetilada, maltosa, glucano, lentinán, manano, levano, hemicelulosa, inulina, fructano, lactosa aislados y purificados y mezclas o combinaciones de los mismos; y uno o más complementos alimentarios seleccionados de antioxidantes, vitaminas, minerales, aminoácidos, ácidos nucleicos, sacáridos, mezclas y combinaciones de los mismos, en el que los polisacáridos de cadena larga y los complementos nutricionales están compactados con rodillos a una presión superior a 2.000 psi.

Otro complemento dietético de liberación modificada de la presente divulgación incluye una cantidad nutricionalmente eficaz de uno o más polisacáridos de cadena larga aislados y purificados, uno o más de antioxidante lipófilo y uno o más de antioxidante lipófilo, en el que el complemento está compactado con rodillos a una presión superior a 5.000 psi.

La presente invención también incluye un procedimiento de fabricación de un complemento dietético de liberación modificada mezclando uno o más sacáridos que comprenden uno o más polisacáridos de cadena larga y una cantidad nutricionalmente efectiva de uno o más complementos nutricionales seleccionados de antioxidantes, vitaminas, minerales, aminoácidos, ácidos nucleicos, extractos herbales, mezclas y combinaciones de los mismos, en el que los polisacáridos de cadena larga comprenden tanto un agente de liberación en tiempo para moléculas bioactivas como una porción del complemento dietético, en el que uno o más de complementos nutricionales comprende antioxidantes que comprenden un desactivador de radical de oxígeno lipófilo aislado y purificado y un desactivador de radical de oxígeno lipófilo aislado y purificado, en el que el desactivador de radical de oxígeno lipófilo y lipófilo tienen un valor de desactivador de radical de oxígeno superior a 6.000  $\mu\text{Mol}$  de Equivalentes Trolox (ET)/gramo; y que está comprimido a una presión superior a 2.000, psi, en el que los polisacáridos de cadena larga que comprenden el agente de liberación en tiempo liberan el complemento nutricional después de que se haya digerido el complemento dietético. El procedimiento se puede usar para fabricar un complemento dietético de liberación modificada que incluye una cantidad nutricionalmente efectiva de uno o más polisacáridos aislados y purificados de goma tragacanto, goma guar, harina de cereal, harina de arroz, caña de azúcar, azúcar de remolacha, patata, leche, agar, algina, goma de garrofín, psilio, goma karaya, gomas de semillas, extracto de árbol de alerce, extracto de aloe vera, goma gati, almidón, celulosa, celulosa degradada, fructosa, jarabe de maíz alto en fructosa, pectina, quitina, acacia, goma arábica, ácido alginico, carragenano, dextrano, goma de xantano, sulfato de condroitina, sacarosa, polimano acetilada, maltosa, glucano, lentinán, manano, levano, hemicelulosa, inulina, fructano, lactosa y mezclas o combinaciones de los mismos y uno o más complementos alimentarios seleccionados de antioxidantes, vitaminas, minerales, aminoácidos, ácidos nucleicos, mezclas y combinaciones de los mismos, en

el que los polisacáridos y los complementos nutricionales están compactados a una presión superior a 2.000 psi.

La presente divulgación también incluye sensores de antioxidantes y procedimientos que miden directamente los niveles de oxidación de muestra total y el efecto de los antioxidantes sobre el estado de oxidación de la muestra total. La invención también incluye composiciones y procedimientos que son útiles para proporcionar cantidades efectivas de antioxidantes a un individuo para su salud óptima. El aparato y procedimiento que se desvela en el presente documento detectan la capacidad de antioxidantes total de una muestra, simultáneamente y directamente en tiempo real. Los presentes inventores han reconocido que la técnica ha creado artificialmente dos categorías mutuamente exclusivas de antioxidantes (lipófilos y lipófobos) y los ha medido por separado. Además, la técnica también ha medido en general la existencia de los radicales directamente, es decir, mediante el uso de una molécula indicadora detectable.

La presente divulgación supera las limitaciones en la técnica anterior sobre detectores y procedimientos mediante el uso de un sistema rápido, rentable y de detección directa. Para abordar estas limitaciones, los presentes inventores han desarrollado el aparato de oxígeno de capacidad de absorbancia de radical de oxígeno ORAC(o) y el procedimiento que se desvela en el presente documento. Mediante el uso del aparato ORAC(o), los presentes inventores fueron capaces de medir, por primera vez, el efecto de tanto el efecto de ambos antioxidantes lipófilos y lipófobos en niveles de oxígeno disuelto, simultáneamente y en tiempo real. Mediante el uso del ensayo de ORAC(o), los inventores también fueron capaces de desarrollar una composición antioxidante sinérgica, que se podría usar sola o en combinación con uno o más potenciadores antioxidantes.

Más particularmente, la presente divulgación incluye un aparato para detectar directamente la actividad antioxidante de antioxidantes tanto lipófilos como lipófobos que incluye un sensor de oxígeno disuelto en comunicación fluida con una muestra y una molécula sensibles al radical de oxígeno en una mezcla de disolvente/agua/tensioactivo; en la que el sensor sensible al radical de oxígeno detecta simultáneamente antioxidantes tanto lipófilos como lipófobos en la mezcla de disolvente/agua/tensioactivo. La molécula sensible al radical de oxígeno pueden ser moléculas que reaccionarán con oxígeno, por ejemplo, moléculas con enlaces dobles conjugados; o compuestos que contienen nitrógeno o azufre. Ejemplos de molécula sensible al radical de oxígeno, por ejemplo, fluoresceína, β-Ficoeritrina (β-PE), glutatión-S-transferasa, ácido linoleico y combinaciones de los mismos. El nivel de radicales de oxígeno se determina directamente mediante el uso de un medidor o sensor de oxígeno en una mezcla de disolvente/agua/tensioactivo. El nivel de oxígeno disuelto se puede determinar mediante el uso de un sensor de oxígeno, por ejemplo, un sensor de oxígeno electroquímico, quimioluminiscente, de resonancia de plasmón superficial, infrarrojo, de acoplamiento capacitivo, de fibra óptica acoplada a tinte o hiperespectral. El medidor o sensor de oxígeno disuelto puede colocarse en línea para el análisis de alto rendimiento, puede ser un único detector de muestras y/o puede estar adaptado para la oficina o incluso para su uso en el hogar. el disolvente puede ser un disolvente orgánico, por ejemplo, acetona. El tensioactivo puede ser un detergente, por ejemplo, un detergente no iónico tal como Tween-20. El disolvente en la mezcla de disolvente/agua/tensioactivo es en general, al menos de aproximadamente el 10 al 90 por ciento en volumen de la mezcla de disolvente/agua/tensioactivo, por ejemplo, 33 %. El agua en la mezcla de disolvente/agua/tensioactivo es en general, al menos de aproximadamente el 10 al 90 por ciento en volumen de la mezcla de disolvente/agua/tensioactivo, por ejemplo, del 33 al 67 %. El tensioactivo (o detergente) en la mezcla de disolvente/agua/tensioactivo es al menos de aproximadamente el 0,1 al 10 por ciento en volumen de la mezcla de disolvente/agua/tensioactivo y puede almacenarse disuelto en agua. En un ejemplo específico, la relación de disolvente/agua/tensioactivo es de aproximadamente 1:1:1.

El aparato puede incluir adicionalmente uno o más procesadores, por ejemplo, un ordenador que puede: controlar el detector, capturar datos, almacenar datos, realizar cálculos basándose en los datos y/o una base de datos de información y/o mostrar los datos o resúmenes de los datos en forma de tablas, gráficos, diagramas o similares. El procesador/ordenador también puede estar conectado e incluir controlar un sistema fluido que está en comunicación fluida con el sensor de oxígeno y la mezcla de disolvente/agua/detergente. El aparato desvelado mide un área bajo la curva que se refiere a la desaparición relativa de oxígeno que resulta de la actividad de una muestra que está siendo sometida a ensayo para su capacidad antioxidante con respecto a la desaparición relativa de oxígeno observada como resultado de la actividad de un estándar desconocido. Mediante el uso de la presente invención y los procedimientos que se describen en el presente documento, el nivel de oxígeno disuelto se mide directamente en la solución incluye antioxidantes tanto lipófilos como lipófobos, simultáneamente. Un ejemplo de la fórmula para calcular el AUC puede ser:

$$\text{ORAC(o)} = \frac{\text{AUC}_{\text{SMP}} - \text{AUC}_{\text{BLNK}}}{\text{AUC}_{\text{TRLX}} - \text{AUC}_{\text{BLNK}}} \times 1000 \text{ (mg/gr)} \times \text{[TRLX } (\mu\text{mol/ml)]}$$

[SMP (mg/ml)]

en la que AUC<sub>SMP</sub> es el valor del área bajo la curva de la muestra;

en la que AUC<sub>BLNK</sub> es el área bajo la curva del blanco;

en la que AUC<sub>TRLX</sub> es el valor del área bajo la curva para Trolox®;

y en la que SMP es la muestra.

Se desvela un procedimiento de determinación directamente de la actividad antioxidante que incluye las etapas de: determinar el nivel de oxígeno disuelto en una solución de ensayo disuelta en una mezcla de disolvente/agua/tensioactivo en presencia de uno o más antioxidantes y una diana de radical de oxígeno, en el que se mide la actividad antioxidante soluble tanto acuosa como lipídica con un detector de oxígeno. El nivel de radical de oxígeno disuelto puede determinarse usando un detector de oxígeno, por ejemplo, sensor de oxígeno electroquímico, quimioluminiscente, de resonancia de plasmón superficial, de acoplamiento capacitivo, de fibra óptica acoplada a tinte o hiperespectral. La actividad antioxidante puede medirse a aproximadamente 37 grados centígrados. Ejemplos de iniciadores de radicales incluyen, por ejemplo, diclorhidrato de 2,2'-azobis[2-(5-metil-2-imidazolin-2-il)propano], diclorhidrato de 2,2' azobis (2-amidinopropano) (AAPH), diclorhidrato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)[2-(N-estearil)amidinopropano] (SA-1), diclorhidrato de 2,2'-azo(2-(2-imidiazolin-2-il)-propani)-[2-[2-(4-n-octil)imidazolin-2-il]-propanoe] (C-8), 2,2'-azobis(4-metoxi-2,4-dimetilvaleronitrilo) (MeO-AMVN), 2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitrilo) (AMVN), azo-bis-isobutílnitrilo, 2,2'-azobis (2-metilpropionati) (DAMP) y 2,2'-azobis(2-amidinopropano), sales, mezclas y equivalentes de los mismos. El detector puede ser incluso desechable.

La presente invención también incluye un complemento dietético que incluye cualquier antioxidante lipófilo aislado y purificado y cualquier antioxidante lipófilo aislado y purificado, en el que los antioxidantes lipófilos y lipófilos combinados tienen un valor de oxígeno disuelto superior a 6.000  $\mu\text{Mol}$  de Equivalentes Trolox® (ET)/gramo. El experto en la técnica reconocerá que el valor también puede expresarse como equivalentes líquidos, por ejemplo, 6.000  $\mu\text{Mol}$  de Equivalentes Trolox® (ET)/mililitro. El antioxidante lipófilo y lipófilo se liberan en tiempo y puede incluir una o más vitamina E seleccionada de tocoferoles alfa, beta, delta, épsilon, gamma, zeta, eta, xi1, xi2 y sigma, y tocotrienoles alfa, beta, delta y gama, análogos de los mismos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y combinaciones de los mismos. Ejemplos de antioxidantes lipófilos incluyen quercetina, caemferol, miricetina, apigenina y derivados, análogos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y combinaciones de los mismos.

El complemento dietético que incluye un complemento dietético que incluye cualquier antioxidante lipófilo aislado y purificado y cualquier antioxidante lipófilo aislado y purificado, también puede incluir dos o más sacáridos esenciales, por ejemplo, galactosa, galactosamina, glucosamina, glucosa, manosa, manosa acetilada, ácido N-acetilneuramínico, fucosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina y/o xilosa. En una realización, el complemento también incluye una fuente de vitamina C, por ejemplo, una fuente vegetal con un alto nivel de vitamina C natural, biodisponible tal como ciruela australiana (*Terminalia ferdinandiana*). En otra realización específica, la vitamina C es un potenciador de la actividad antioxidante de una fuente vegetal de vitamina C tal como ciruela australiana silvestre (*Terminalia ferdinandiana*), que tiene un porcentaje superior de vitamina C que la ciruela que se cultiva en granjas. El complemento también puede incluir uno o más probióticos, por ejemplo, especie *Lactobacillus* y especie *Bifidobacterium*. El complemento puede estar comprimido para proporcionar una superficie en general impermeable de oxígeno, por ejemplo, una partícula comprimida con rodillos, una cápsula, un comprimido, un minicomprimido, un comprimido oblongo, un comprimido efervescente o combinaciones de los mismos.

Como punto de comparación con el aparato de ORAC(o) y el procedimiento que se describe en el presente documento anteriormente, los antioxidantes lipófilo y lipófilos aislados y purificados, tendrán un valor de ORAC(flipo) antioxidante superior a 7.000  $\mu\text{Mol}$  de Equivalentes Trolox® (ET)/gramo. La presente invención se usó en un estudio de "etiqueta abierta" para medir el cambio de los niveles de antioxidante en cada individuo que tomaba una mezcla de antioxidante/gluconutriente que incluía los antioxidantes de la presente invención en sus dietas. Cuando se administra a un paciente, los antioxidantes lipófilos y lipófilos proporcionaron un aumento promedio de más del 13 % según se midió mediante ORAC( $\beta$ -PE) a partir del nivel de antioxidante del valor basal promedio de la población de paciente cumulativo. La presente invención también incluye un número de composiciones. Las composiciones que se desvelan en el presente documento se basan en el reconocimiento de que los complementos dietéticos disponibles actualmente no combinan antioxidantes lipófilo y lipófilos con actividades medibles por encima de las esperadas a partir de los componentes individuales. Mediante el uso del aparato desvelado y el procedimiento inventivo, los inventores fueron capaces de desarrollar combinaciones sinérgicas de no solo antioxidantes lipófilo y lipófilos, sino de también añadir potenciadores de la actividad antioxidante.

Los flavonoides como la quercetina han demostrado recientemente aumentar la transcripción de la subunidad pesada de la enzima limitante de velocidad en la síntesis del glutatión, gama-glutamylcisteína sintetasa, mediante los elementos de respuesta antioxidante del gen. La transcripción aumentada se traduce posteriormente en niveles intracelulares aumentados de glutatión reducida (activa en células de cultivo tisular). La quercetina es un componente principal del vino tinto, la piel de la uva y las cebollas. Estudios de la quercetina a partir de vino tinto, piel de uva y cebollas sugieren efectos beneficiosos en la salud. La quercetina ha mostrado absorberse bien por los seres humanos. Un estudio mostró que toda la quercetina ingerida se metabolizó dos horas después de una comida (European Research on Functional Effects of Dietary Antioxidants, 25 -28 de septiembre de 2002, Cambridge, Reino Unido). Cuando se encontró oxidación de LDL sustancialmente reducida en sujetos que consumían cantidades moderadas de vino tinto, los investigadores confirmaron los efectos protectores podrían atribuirse muy probablemente a la actividad de la quercetina y sus metabolitos. La quercetina también ha demostrado potenciar la estabilidad de los eritrocitos.

Los presentes inventores han reconocido que debido a los numerosos y diversos factores que influyen el estrés oxidativo, podría ser necesario personalizar la complementación antioxidante según las necesidades del individuo y la química. Además, se reconoció que se requería una combinación de tocoferoles para cumplir las distintas necesidades de los individuos. La combinación de tocoferoles es necesaria puesto que algunos antioxidantes son "seleccionados" por el organismo. Por ejemplo, la forma predominante de vitamina E en la dieta norteamericana es el gama-tocoferol, que se encuentra comúnmente en aceites vegetales así como en productos procedentes de soja y maíz. Sin embargo, el organismo retiene predominantemente alfa-tocoferol. Como procedimiento específico, que se basa en la proteína de transferencia de alfa-tocoferol se ha encontrado que regula la concentración de alfa-tocoferol en el organismo. A diferencia de las composiciones antioxidantes en la técnica anterior, la presente invención usa tocoferoles mezclados para proporcionar al organismo muchas formas de vitamina E, permitiendo la selección, retención y uso de las cantidades óptimas de cada forma. Además, la combinación sinérgica de quercetina y tocoferoles mezclados proporciona al organismo una amplia gama de selección óptima de nutrientes antioxidantes, que pueden diferir dependiendo de las necesidades del individuo.

Los presentes inventores han buscado maximizar adicionalmente la actividad de la combinación sinérgica de quercetina y tocoferol mezclado mediante la adición de compuestos que ayudan a potenciar la actividad de estos antioxidantes. Un tal potenciador es la Vitamina C. La Vitamina C tiene una actividad antioxidante significativa atribuida a esta así como varias funciones nutritivas no antioxidantes. Muchos atribuyen propiedades pro-oxidantes a la vitamina C, especialmente en presencia de metales de transición. Las propiedades pro-oxidantes de la vitamina C pueden no ser completamente destructivas. Sin embargo, otros investigadores aseguran que han encontrado que la vitamina C se comporta como un antioxidante, incluso en presencia de metales no enlazados. Otros potenciadores de la actividad antioxidante incluyen extractos naturales, tales como extracto de semilla de uva y extracto de té verde. En un estudio, el té verde mostró una actividad antimutagénica potente in vitro e inhibió el desarrollo de lesiones preneoplásicas inducidas por carcinógenos en el colon de ratas. El té verde también inhibió significativamente la formación de pólipos intestinales. Por lo tanto, los presentes inventores combinaron no solo una combinación sinérgica de antioxidantes purificados y aislados de fuentes naturales, tales como quercetina y tocoferoles mezclados, sino que añadieron además potenciadores que aumentaron la actividad antioxidante detectable de estos agentes.

Más particularmente, las composiciones de un complemento dietético que incluye una cantidad nutricionalmente efectiva de dos o más sacáridos esenciales; un desactivador del radical de oxígeno lipófilo aislado y purificado; y un desactivador del radical de oxígeno lipófilo aislado y purificado, en el que los desactivadores del radical de oxígeno lipófilo y lipófilo tienen un valor de desactivador de radical de oxígeno superior a 6.000  $\mu\text{Mol}$  de Equivalentes Trolox® (ET)/gramo. En un ensayo, el desactivador de radical de oxígeno lipófilo y lipófilo cuando se proporciona a un paciente proporciona un aumento promedio de más del 13 % según se midió mediante ORAC(fl-lipo) a partir del nivel de antioxidante del valor basal de la población de paciente. El desactivador de radical de oxígeno lipófilo y lipófilo se envasan para su liberación extendida y pueden incluir una o más de las siguientes moléculas de vitamina E: tocoferoles alfa, beta, delta, épsilon, gamma, zeta, eta, xi1, xi2 y sigma, y tocotrienoles alfa, beta, delta y gama, análogos de los mismos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y combinaciones de los mismos. El desactivador de radical de oxígeno lipófilo puede incluir uno o más de los siguientes: flavonoles, quercetina, caemferol, miricetina, apigenina y derivados, análogos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y combinaciones de los mismos. El complemento puede incluir adicionalmente dos o más sacáridos seleccionados del grupo que consiste en galactosa, glucosa, manosa, ácido N-acetil-neuramínico, fucosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina y xilosa, derivados, análogos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y combinaciones de los mismos.

### **Breve descripción de los dibujos**

Para una comprensión más completa de las características y ventajas de la invención, ahora se hace referencia a la descripción detallada de la invención junto con las figuras adjuntas y en las que:

La FIG. 1 ilustra un aparato antioxidante directo de ORAC(o);

la FIG. 2 es un diagrama de flujo del procedimiento de ORAC(o) de la presente invención;

la FIG. 3 son dos gráficos que comparan la solución de blanco en un ORAC(o) (porcentaje de oxígeno) con las mediciones de ORAC(fl) (fluorescencia) usando un iniciador AAPH, Trolox® como el estándar y ácido linoleico o fluoresceína, respectivamente, como las dianas de radical de oxígeno;

la FIG. 4 son dos gráficos que comparan el estándar de antioxidante Trolox® en un ORAC(o) (porcentaje de oxígeno) con las mediciones de ORAC(fl) (fluorescencia) usando un iniciador AAPH, Trolox® como el estándar y ácido linoleico o fluoresceína, respectivamente, como las dianas de radical de oxígeno;

la FIG. 5 son dos gráficos que comparan la solución de blanco, el estándar y la muestra, en un ORAC(o) (porcentaje de oxígeno) con las mediciones de ORAC(fl) (fluorescencia) usando un iniciador AAPH, Trolox® como el estándar y ácido linoleico o fluoresceína, respectivamente, como las dianas de radical de oxígeno;

la FIG. 6 es un gráfico que muestra un efecto antioxidante de la combinación de quercetina (Q) a 5  $\mu\text{g/ml}$  y

tocoferoles mezclados (TM) a 5 µg/ml en comparación con cada ingrediente por separado a una concentración de 10 µg/ml según se ha medido mediante el procedimiento de ORAC(o) de la presente invención;

5 La FIG. 7 es un gráfico que muestra un efecto antioxidante de la combinación de quercetina (Q) a 5 µg/ml y tocoferoles mezclados (TM) a 5 µg/ml y Trolox® como control medido mediante el procedimiento de ORAC(o) de la presente invención;

la FIG. 8 es un gráfico de los resultados del área bajo la curva (AUC) a partir de la relación titulada de quercetina y tocoferoles mezclados mediante el uso del procedimiento de ORAC(o) para medir la capacidad antioxidante;

10 La FIG. 9 es otro gráfico de los resultados del AUC a partir de la relación titulada de quercetina y tocoferoles mezclados que usan el procedimiento de ORAC(o) para medir la capacidad antioxidante que demostró los resultados esperados (línea) y el grado de sinergia detectada por encima de la línea en comparación con los resultados esperados a partir de la titulación de la quercetina y los tocoferoles mezclados;

15 La FIG. 10 es un gráfico que muestra los resultados de ensayos de ORAC(o) para relaciones variantes de extracto de piel de uva y extracto de té verde en la presencia del 49,18 % de quercetina, 32,79 % de tocoferoles y 1,64 % de ciruela. La relación óptima del extracto de piel de uva con respecto al extracto de té verde es de 60/40 a 80/20;

la FIG. 11 es un gráfico que muestra los resultados de ORAC(fl) de la combinación de quercetina (Q) a 5 µg/ml y tocoferoles mezclados (TM) a 5 µg/ml en comparación con cada ingrediente por separado a una concentración de 10 µg/ml.

20 La FIG. 12 es un gráfico de un ensayo ORAC(fl) que mide una titulación de quercetina frente a α-tocoferol disuelto en acetona:agua;

La FIG. 13 es un gráfico de un ensayo ORAC(fl) que mide la actividad antioxidante medida para una relación fija de quercetina: α-tocoferol relación disuelta en una mezcla de disolvente:agua: detergente;

25 La FIG. 14 es un gráfico de un ensayo ORAC(fl) que mide la actividad antioxidante medida para una relación fija de quercetina:α-tocoferol relación disuelta en dos relaciones distintas de disolvente:agua con respecto a mezclas de detergentes;

La FIG. 15 es un gráfico que muestra los valores de ORAC(o) obtenidos con distintas relaciones de quercetina y tocoferoles mezclados;

La FIG. 16 es un gráfico que muestra los valores de ORAC(o) para una relación distinta de extracto de semilla de uva y extracto de té verde;

30 La FIG. 17 es un gráfico que muestra los valores de ORAC(o) de la combinación del máximo de las relaciones de quercetina:tocoferol mezclado y el extracto de semilla de uva y extracto de té verde;

La FIG. 18 muestra los tres módulos seleccionados para la investigación inicial; y

las FIG. 19 y 20 son gráficos que muestran los perfiles de liberación relativos de quercetina mediante HPLC y UV/Vis, respectivamente.

### 35 **Descripción detallada de la invención**

Mientras que la realización y uso de diversas realizaciones de la presente invención se describen en detalle a continuación, debe apreciarse que la presente invención proporciona muchos conceptos inventivos aplicables que pueden materializarse en una amplia variedad de contextos específicos. Las realizaciones específicas descritas en el presente documento son simplemente ilustrativas de modos específicos de realizar y usar la invención y no delimitan el ámbito de la invención.

45 Para facilitar la comprensión de la presente invención, se define un número de términos a continuación. Los términos que se describen en el presente documento tienen significados comúnmente comprendidos por un experto en la técnica habitual en las áreas relevantes con respecto a la presente invención. Términos tales como "un", "uno/a" y "el/la" no están previstos para referirse solo a una entidad singular, sino que incluyen la clase general de la que se puede usar un ejemplo específico para su ilustración. La terminología en el presente documento se usa para describir realizaciones específicas de la invención, pero su uso no delimita la invención, excepto como se esboza en las reivindicaciones.

50 La presente invención se basa, en parte, en el reconocimiento de que la técnica ha creado artificialmente dos categorías mutuamente exclusivas de antioxidantes y los ha medido por separado. Además, la técnica también ha medido en general la existencia de los radicales directamente, es decir, mediante el uso de una molécula indicadora. La presente invención proporciona un procedimiento que no solo detecta la capacidad de antioxidantes total de una muestra, simultáneamente, sino que también lo hace directamente.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sacáridos esenciales", se usa para definir los monosacáridos comúnmente encontrados en las cadenas de oligosacárido de glicoproteínas celulares y que pueden no estar fácilmente disponibles mediante la dieta o fabricación bioquímica del organismo humano (véase, por ejemplo, Harper's Biochemistry (Murray y col., 1996)(enumeración ocho) y Principles of Biochemistry, Vol II (Zubay, y col., 1995)(enumeración once). Mientras que se han encontrado sobre 200 monosacáridos en la naturaleza, estos once se cree que son importante en el mantenimiento de una buena salud en los mamíferos: galactosa, glucosa, manosa, ácido N-acetilneuramínico, fucosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, xilosa, ácido idurónico, arabinosa y ácido glucurónico. Las estructuras de estos carbohidratos son bien conocidas (véase, por ejemplo, Stryer's Biochemistry (Stryer, 1995) y el Índice de Merck, 12ª edición, 1996).

Como se usa en el presente documento, las expresiones, "sacáridos de cadenas larga" y "polisacáridos de cadena larga" se usan para describir aquellas cadenas de sacáridos que tienen dos o más sacáridos que son capaces de unir hidrógeno intracatenario. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos N.º 4.735.935 enseña los procedimientos de aislamiento de polisacáridos de cadena larga de aloe vera, en los que los polisacáridos de cadena larga precipitados, liofilizados tienen de 2 a aproximadamente 50.000 monómeros por cadena. Los polisacáridos de cadena larga pueden aislarse a partir de una variedad de fuentes vegetales y animales, como se enseña y divulga en el presente documento. El aislamiento y purificación de los polisacáridos de cadena larga de la presente invención e incluso el aislamiento de longitudes de cadena específicas o combinaciones de las mismas se puede obtener mediante, por ejemplo, hidrólisis de los polisacáridos de cadena larga, aislamiento en masa de longitudes específicas de polisacáridos de cadena larga, polimerización de polisacáridos de cadena larga más largos, selección de combinaciones de polisacáridos de cadena larga más cortos y más largos, separación de los polisacáridos de cadena larga mediante, por ejemplo, electroporación, FPLC, HPLC, exclusión por tamaños, cromatografía de exclusión por tamaño, precipitación y similares.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "liberación modificada" se usa en el presente documento para describir un perfil de liberación para efectuar el suministro de una cantidad nutricionalmente efectiva de un nutriente durante un período de tiempo extendido, definido en el presente documento como de entre aproximadamente 60 minutos y aproximadamente 2, 4, 6, 8 o más horas usando la formulación de la presente invención. La liberación modificada también puede definirse funcionalmente como la liberación de sobre el 80 al 90 por ciento (%) del nutriente después de aproximadamente 60 minutos y aproximadamente 2, 4, 6 o incluso 8 horas. La liberación modificada también puede evaluarse poniendo a la disposición del paciente o sujeto el nutriente independientemente de su absorción, puesto que algunos activos puede que nunca sean absorbidos por el animal. Se pueden diseñar fácilmente por el experto en la técnica diversas formas de dosificación de liberación modificada tal como se desvela en el presente documento para conseguir el suministro tanto en los intestinos gruesos como delgados, a solo el intestino delgado o solo al intestino grueso, dependiendo de la elección de los materiales de revestimiento y/o grosor de revestimiento. Ejemplos de modificaciones que se pueden realizar a los polisacáridos de cadena larga incluyen, por ejemplo, el cambio de los tipos o composición de sacáridos en los polisacáridos de cadena larga, la modificación química (orgánica o química) de las cadenas laterales de los sacáridos (por ejemplo, acetilación), hidrólisis de los polisacáridos de cadena larga, medición de los polisacáridos de cadena larga, polimerización de polisacáridos de cadena larga más largos, selección de combinaciones de polisacáridos de cadena larga más cortos y más largos, separación de los polisacáridos de cadena larga mediante, por ejemplo, electroporación, FPLC, HPLC, exclusión por tamaños, cromatografía de exclusión por tamaño, precipitación y similares. Se pueden preparar y suministrar formulaciones de liberación prolongada de modo que la liberación se consiga en algún emplazamiento en general predecible en el tracto intestinal inferior más distal al que se hubiera conseguido si no hubiera habido alteraciones de liberación modificada.

La presente invención se podría usar sola o en combinación con uno o más de procedimiento, técnicas, mecánicas, químicas y otra modificación, encapsulación, envasado o similares para retrasar la liberación del nutriente, por ejemplo, una cápsula, una cápsula de gelatina o incluso un revestimiento. Ejemplos de cápsulas incluyen animales, vegetales, poliméricas, mezclas y combinaciones de los mismos. El revestimiento (tipo, grosor, etc.) puede aplicarse a un grosor suficiente de modo que parte o la totalidad del revestimiento no se disuelve en los fluidos gastrointestinales a un pH por debajo de 5, sino que se disuelve a un pH de aproximadamente 5 o superior.

Tal como se usa en el presente documento la expresión "cantidad nutricionalmente efectiva" se usa para definir la cantidad de proporcionará un efecto o respuesta nutricional beneficioso en un mamífero. Por ejemplo, como la respuesta nutricional a los complementos dietéticos que contienen vitaminas y minerales varía de mamífero a mamífero, debe entenderse que las cantidades nutricionalmente efectivas de las vitaminas y minerales variarán, respectivamente. Asimismo, la falta de un aminoácido esencial, vitamina C, hierro, yodo, vitaminas, minerales, carbohidratos, lípidos y similares se conocen por afectar las funciones fisiológicas y celulares. Una cantidad nutricionalmente efectiva de los antioxidantes y sacáridos que se desvelan en el presente documento sirven para conservar y/o elevar los niveles de estos nutrientes importantes en la dieta de, por ejemplo, un humano que busca mantener o aumentar su dieta en estos complementos nutricionales. Por lo tanto, mientras que un mamífero puede requerir un perfil particular de vitaminas y minerales presentes en cantidades definidas, otro mamífero puede requerir el mismo perfil particular de vitaminas y minerales presentes en distintas cantidades definidas.

Tal como se usa en el presente documento, el "antioxidante" se refiere a cualquier molécula que retrase o prevenga la oxidación de una molécula diana oxidable. Los antioxidantes actúan mediante: recuperando radicales libres



biológicamente importantes u otras especies reactivas de oxígeno (por ejemplo,  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , HOCl, ferrilo, peroxilo, peroxinitrito y alcoxilo); previniendo la formación de radicales de oxígeno; o convirtiendo catalíticamente el radical libre u otras especies reactivas de oxígeno en una especie menos reactiva. Los antioxidantes se dividen, en general, en dos clases: (1) antioxidantes lipídicos (lipófilos o hidrófobos); y (2) antioxidantes acuosos (lipofóbos o hidrófilo).

5 Ejemplos de antioxidantes lipídicos incluyen, aunque no de forma limitativa, carotenoides (por ejemplo, lutenína, zeaxantina,  $\beta$ -criptoxantina, licopeno,  $\alpha$ -caroteno y  $\beta$ -caroteno), que se emplazan en el compartimiento del lípido núcleo y tocoferoles (por ejemplo, vitamina E,  $\alpha$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol y  $\delta$ -tocoferol), que se emplazan en la interfaz del compartimiento lipídico y retinoides (por ejemplo, vitamina A, retinol y palmitato de retinilo) y polifenoles solubles de grasa, por ejemplo, quercetina. Ejemplos de antioxidantes acuosos incluyen, aunque no de forma limitativa, ácido  
10 ascórbico y su forma oxidada, "ácido deshidroascórbico", ácido úrico y su forma oxidada "alantoína", bilirrubina, albúmina y vitamina C y polifenoles solubles en agua tales como catequinas, que tienen alta afinidad con las membranas fosfolipídicas, isoflavonas y procianidinas.

Un procedimiento comúnmente usado para detectar los niveles relativos de radicales de oxígeno y capacidad antioxidante es el ensayo de Capacidad de absorbanza de radicales de oxígeno (ORAC). En ensayos tipo ORAC  
15 conocidos, el valor de antioxidante se mide indirectamente midiendo el efecto de un radical de oxígeno sobre, por ejemplo, una molécula fluorescente u otra detectable, que puede o no puede ser una buena diana para la oxidación por el radical de oxígeno particular. En general, cuando se añaden antioxidantes a una muestra de ensayo, se puede observar en la muestra una disminución detectable en la cantidad de radical libre, tal como superóxido o una especie de oxígeno reactiva de no radical, tal como peróxido de hidrógeno, en comparación con una muestra sin tratar con el  
20 antioxidante (es decir, muestra del control). Sin embargo, estos procedimientos indirectos controlan el cambio en el estado antioxidante mediante un intermediario (por ejemplo, fluoresceína,  $\beta$ -fitoeritrina ( $\beta$ -PE), etc.) medido según la hipótesis de que el efecto del radical sobre el intermediario es un verdadero reflejo del nivel relativo de oxidantes y antioxidantes. Los controles para estos ensayos son concentraciones conocidas de generadores de radicales de oxígeno y antioxidantes conocidos que se miden y usan como estándares para las muestras.

25 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "radical libre" se refiere a moléculas que contienen al menos un electrón desaparejado. La mayoría de moléculas contienen números iguales de electrones y sus enlaces covalentes incluyen normalmente pares de electrones compartidos. La escisión de tales enlaces produce dos radicales libres separados, cada uno con un electrón desaparejado (además de cualquier electrón emparejado). Los radicales libres pueden estar eléctricamente cargados o neutrales, son altamente reactivos y normalmente de corta  
30 vida. Los radicales libres se combinan entre sí o con átomos que tienen electrones desaparejados. En reacciones con moléculas intactas, los radicales libres intentan completar su propia estructura electrónica, generando nuevos radicales, que siguen para reaccionar con otras moléculas creando una reacción en cadena. Las reacciones en cadena de radicales libres son particularmente importantes en la descomposición de sustancias a altas temperaturas y en polimerización. En el cuerpo, los radicales libres oxidados son responsables de los daños en los tejidos. El calor, la luz ultravioleta y la radiación ionizante todos generan radicales libres. Los radicales libres se generan como un efecto secundario del metabolismo oxidativo. Un exceso de radicales libres puede sobrepasar las enzimas protectoras naturales tales como el superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa. Los radicales libres tales como peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radical de hidroxilo ( $HO\cdot$ ), oxígeno de singlete ( $O^1O_2$ ), radical aniónico de superóxido ( $O\cdot^-$ ), radical de óxido nítrico ( $NO\cdot$ ), radical de peroxilo ( $ROO\cdot$ ), peroxinitrito (ONOO) pueden estar o bien en el  
40 compartimiento lipídico o bien en el acuoso. Los nutrientes de antioxidantes (por ejemplo, vitaminas C y E, selenio, polifenoles) pueden reducir estos efectos.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "compartimiento lipídico" se refiere a compuestos que tienen hidrocarburos de cadena larga cíclicos o acíclicos y sus derivados, tales como ácidos grasos, alcoholes, aminas, alcoholes amino y aldehídos. Por ejemplo, lípidos comunes incluyen ácidos grasos, grasas, fosfolípidos,  
45 esteroides, eicosanoides, ceras y vitaminas solubles en grasa. Algunos lípidos pueden clasificarse, en general, en dos grupos, los lípidos simples y los lípidos complejos, por ejemplo, triglicéridos o grasas y aceites, ésteres de ácido graso de glicerol, ceras, ésteres de ácidos grasos de alcoholes de cadena larga y esteroides tales como colesterol y ergosterol. Lípidos complejos incluyen, por ejemplo, fosfatidas o fosfolípidos (lípidos que contienen fósforo), glicolípidos (lípidos que contienen carbohidratos) y esfingolípidos (lípidos que contienen esfingosina).

50 Tal como se usa en el presente documento, el término "lípido" incluye grasas o sustancias tipo grasa. El término es descriptivo en lugar de un nombre químico tal como proteína o carbohidrato. Lípidos incluyen grasas verdaderas (es decir, ésteres de ácidos grasos y glicerol), lipoides (es decir, fosfolípidos, cerebrósidos, ceras) y esteroides (es decir, colesterol, ergosterol). Los lípidos pueden ser una diana de oxidación mediante mecanismos, tales como autooxidación. Tal como se usa en el presente documento, el término "ácido graso" se refiere a un grupo de, por  
55 ejemplo, cadenas de hidrocarburos negativamente cargadas, generalmente lineales. Las cadenas de hidrocarburos de ácidos grasos pueden variar en longitud y estados de oxidación. En general, los ácidos grasos tienen una porción negativamente cargada (por ejemplo, en el extremo carboxilo) y una porción de "cola", que determina la solubilidad en agua y características anfipáticas del ácido graso. Por ejemplo, los ácidos grasos son componentes de los fosfolípidos que incluyen membranas biológicas, como grasas, que se usan para almacenar energía dentro de las  
60 células o para transportar grasa en el torrente sanguíneo. Tal como se usa en el presente documento, el término "fosfolípido" se refiere a cualquiera de la clase de ésteres de ácido fosfórico que incluye al menos uno de los siguientes grupos laterales: un ácido graso, un alcohol y una base nitrogenada.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término "grasa" o "grasas" se refiere a cualquiera de los ésteres de glicerilo de ácidos grasos, por ejemplo, las formas de monoacilglicerol, diacilglicerol y triacilglicerol de ácidos grasos. Los triglicéridos se refieren a aquellas moléculas que están neutralmente cargadas y son enteramente hidrófobas, es decir, moléculas reducidas. Los monoacilglicéridos y diacilglicéridos son intermediarios metabólicos en la síntesis de fosfolípidos, mientras que los triglicéridos forman las moléculas grasas que se usan para almacenar energía química en un estado sin agua, compacto. Tal como se usa en el presente documento, el término "vitaminas solubles en grasa" se refiere a, por ejemplo, vitaminas solubles en grasa comunes que incluyen vitamina (A) (retinol), vitamina D (por ejemplo, vitamina D3 (colecaciferol)), vitamina E, vitamina K y similares.

10 Tal como se usa en el presente documento, la frase "actividad antioxidante lipídica" o "capacidad antioxidante lipídica" se usan indistintamente y se refieren a la medición de capacidad antioxidante que surge del compartimiento lipídico de una muestra. Tal como se usa en el presente documento, la frase "actividad antioxidante acuosa" o "capacidad antioxidante acuosa" se usan indistintamente y se refieren a la medición de capacidad antioxidante que surge del compartimiento acuoso de una muestra. Tal como se usa en el presente documento, la frase "actividad antioxidante total" o "capacidad antioxidante total" se usan indistintamente y se refieren a la medición de capacidad antioxidante que surge tanto de las porciones lipídicas como acuosas de una muestra.

15 Tal como se usa en el presente documento, la frase "compartimiento acuoso" se refiere a la porción de una muestra de fluido que no interactúa con el compartimiento lipídico. El compartimiento acuoso incluye muestras de fluido biológico tales como sangre, plasma, suero, heces, fluido cerebroespinal, líquido amniótico, líquido intersticial, fluido linfático y fluido sinovial. Por ejemplo, el compartimiento acuoso de una muestra de fluido tal como suero puede incluir no solo la porción líquida que permanece después de que se haya dejado coagular la sangre y se centrifuga para retirar los glóbulos rojos y elementos de coagulación, sino también otros compuestos tales como: proteínas, por ejemplo, albúmina y globulinas; anticuerpos; enzimas; pequeñas cantidades de materiales orgánicos nutritivos, tales como aminoácidos y glucosa; sustancias inorgánicas tales como sodio, cloruro, sulfatos, fosfatos, calcio, potasio, bicarbonato, magnesio, yodo, zinc y hierro; pequeñas cantidades de productos de desecho, tales como urea, ácido úrico, xantina, creatinina, creatina, pigmentos biliares y amoníaco; y cantidades traza de gases tales como oxígeno y dióxido de carbono. La muestra de fluido también puede ser una muestra no biológica, por ejemplo, formulaciones químicas, composiciones sintéticas o productos alimentarios y productos cosméticos.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término "muestra" se refiere a una muestra biológica líquida o de fluido o una muestra biológica sólida en la que se pueden generar radicales libres usando un generador de radicales libres, (por ejemplo, un generador de radicales libres lipófilo o un generador de radicales libres hidrófilo) y pueden detectarse usando el detector de (ORAC(o)) y el procedimiento de la presente invención. Muestras biológicas incluyen, por ejemplo, sangre, plasma, suero, fluido cerebroespinal, orina, líquido amniótico, fluido intersticial y fluido sinovial. Muestras biológicas sólidas incluyen, por ejemplo, un tejido, células, cultivo tisular, células fijadas, sobrenadantes celulares o porciones iguales (o extractos) de tejido o materia celular. El término muestra también incluye muestras no biológicas tales como una solución química, una composición sintética y alimentos. Tal como se usa en el presente documento, los términos "ORAC(o) relativo" y "ORAC(o)" se refieren al mismo valor, que se mide mediante equivalencia de micromoles de Trolox® por gramo o mililitro. Un valor de ORAC(o) negativo refleja menos actividad de desactivación de radicales que la obtenida con un blanco lo que indica que una composición es pro-oxidante, es decir, un agente que promueve la oxidación, en lugar de actuar como antioxidante.

30 Tal como se usa en el presente documento, las frases "generador de radicales" o "iniciador de radicales" se usan indistintamente y se refieren a un agente, compuesto o molécula que produce radicales libres. El generador de radicales es capaz de producir radicales libres a un nivel medido, por ejemplo, a un nivel en el que los antioxidantes o indicadores oxidables pueden interactuar con los radicales libres para producir una producción medible o detectable. Ejemplos de generadores de radicales incluyen, por ejemplo, generadores de radicales azo, que son compuestos que producen un flujo de radicales libres a una tasa constante conocida. Ejemplos de generadores de radicales azo incluyen, por ejemplo, 2,2'-azobis(4-metoxi-2,4-dimetilvaleronitrilo) (MeO-AMVN), 2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitrilo) (AMVN), azo-bis-isobutilnitrilo, 2,2'-azobis (2-metilproprionati) (DAMP) y 2,2'-azobis-(2-amidinopropano), diclorhidrato de 2,2'-azobis[2-(5-metil-2-imidazolin-2-il)propano], hierro, ácido ascórbico e iones de metales.

40 Tal como se usa en el presente documento, el "sujeto" se refiere a cualquier organismo vivo. El término "sujeto" incluye, por ejemplo, pez, mamíferos, reptiles, aves, insectos y similares. Los ejemplos específicos incluyen: seres humanos, primates no humanos tales como chimpancés y otros simios y especies de monos; animales de granja, tales como ganado vacuno, oveja, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos, tales como perros y gatos; animales de laboratorio, incluyendo roedores, tales como ratones, ratas y cobayas y similares. El término no denota una edad o sexos concretos. Por lo tanto, sujetos adultos y recién nacidos, así como fetos, sean macho o hembra, se prevén que estén incluidos.

50 Tal como se usa en el presente documento, la frase "trastorno asociado con radicales libres" se refiere a una afección patológica de la producción de o exposición a radicales libres. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "trastorno asociado con radicales libres" incluye estados patológicos en los que el daño de radicales libres contribuye en la patología del estado enfermo o en la que la administración de un inhibidor de radicales libres (por ejemplo, deferoxamina), agentes de eliminación (por ejemplo, tocoferol, glutatión) o catalizador (por ejemplo,

SOD, catalasa) muestran que producen un beneficio detectable aumentando los síntomas, aumentando la supervivencia y proporcionando otros beneficios clínicos detectables en la protección o prevención del estado patológico. Ejemplos de trastornos de radicales libres incluyen, aunque no de forma limitativa, lesión por reperfusión isquémica, enfermedades inflamatorias, lupus sistémico eritematoso, infarto de miocardio, apoplejía, hemorragia traumática, trauma de la médula espinal, enfermedad de Crohn, enfermedades autoinmunitarias (por ejemplo, artritis reumatoide, diabetes), formación de cataratas, degeneración macular asociada a la edad, enfermedad del Alzheimer, uveítis, enfisema, úlceras gástricas, toxicidad de oxígeno, neoplasia, apoptosis celular no deseada y náuseas por radiación.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "estrés oxidativo" se refiere al nivel de daños producidos por los radicales libres de oxígeno en un sujeto. El nivel de daño depende de la rapidez en la que se crean las especies de oxígeno y, a continuación, se desactivan por los antioxidantes así como el emplazamiento y velocidad de reparación. Tal como se usa en el presente documento, el término "desviación" o "desvió" con respecto al estado oxidativo y estrés oxidativo se usan indistintamente y se refieren a un cambio en la actividad antioxidante de una muestra. El cambio en el estado oxidativo puede ser un aumento, disminución, elevación o descenso de la actividad antioxidante a partir de un valor normal conocido. Por ejemplo, un aumento o disminución de la actividad antioxidante en el compartimiento lipídico de una muestra, el compartimiento acuoso de una muestra o en tanto el compartimiento lipídico como acuoso de una muestra.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "sal farmacéuticamente aceptable" de los nutrientes se usa para describir aquellas sales que, dentro del ámbito del buen criterio médico, son adecuadas para su uso en, sobre o con los tejidos de seres humanos y animales inferiores sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica indebidas y similares y son proporcionales con una relación de beneficio/riesgo razonable. Sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, y col., J. Pharmaceutical Sciences, 1977). Se pueden preparar sales adecuadas durante el aislamiento final y purificación de los compuestos de la invención o por separado haciendo reaccionar la función de base libre con un ácido orgánico adecuado. Las sales de adición de ácido representativas incluyen, pero sin limitación, acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, sulfonato de benceno, bisulfato, butirato, alcanforato, sulfonato de canfor, digluconato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, fumarato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxi-etanosulfonato (isotionato), lactato, maleato, sulfonato de metano, nicotinato, 2-naftalensulfonato, oxalato, palmitoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, fosfato, glutamato, bicarbonato, sulfonato de p-tolueno y undecanoato. Ejemplos de grupos que contienen nitrógeno básico que se usan como agentes de cuaternización incluyen: haluros de alquilo inferior (cloruros de metilo, etilo, propilo y butilo, bromuros y yoduros); sulfatos de dialquilo (sulfatos de dimetilo, dietilo, dibutilo y diamilo); haluros de cadena larga (cloruros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo, bromuros y yoduros); haluros de arilalquilo (bromuros de bencilo y fenetilo) y similares. Ejemplos de ácidos que pueden emplearse para formar sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables incluyen ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico y tales ácidos orgánicos como ácido oxálico, ácido maleico, ácido succínico y ácido cítrico. Sales de adición básicas también pueden prepararse in situ durante el aislamiento y purificación final de los compuestos antioxidantes desvelados en el presente documento con una base adecuada tal como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión de metal farmacéuticamente aceptable o con amoniaco o una amina primaria, secundaria o terciaria orgánica. Sales farmacéuticamente aceptables incluyen, aunque no de forma limitativa, cationes basados en metales alcalinos o metales alcalinotérreos tales como sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio y similares y amonio cuaternario no tóxico y cationes de amina incluidos aminio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamonio, dimetilamonio, trimetilamonio, trietilamonio, dietilamonio y etilamonio entre otros. Otras aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de bases incluyen etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperidina, piperazina y similares.

Tal como se usa en el presente documento, el término "potenciar" se refiere a uno o más agente que actúa directa o indirectamente para aumentar o potenciar la actividad de los antioxidantes lipófilos y/o lipófilos de la presente invención. Un tal potenciador es la vitamina C, que puede actuar para reactivar o reciclar los antioxidantes y puede por sí mismo tener una actividad antioxidante significativa. Las propiedades pro-oxidantes de la vitamina C se han observado en presencia de metales de transición. Otros potenciadores de la actividad antioxidante incluyen extractos naturales, tales como extracto de semilla de uva y extracto de té verde. En un estudio, el té verde mostró una potente actividad antimutagénica in vitro e inhibió el desarrollo de lesiones preneoplásicas inducidas por carcinógenos en el modelo de animal. Por tanto, el potenciador aumenta o incluso sinergiza con los antioxidantes purificados y aislados de fuentes naturales, tales como quercetina y tocoferoles mezclados.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "gluconutricional" o "gluconutriente" se refiere a carbohidratos o sacáridos complejos o azúcares simples que se sintetizan en la naturaleza y son necesarios para la síntesis bioquímica de diversas clases de moléculas de comunicación y señalización que pueden estar libres en fluidos celulares intersticiales, activas en la comunicación célula a célula (es decir, citocinas, factores de crecimiento, etc.) o constituyen la configuración molecular que comprende focos de actividad molecular altamente específica de membranas celulares (es decir, sitios receptores, canales de transporte iónico, identificación antigénica y similares).

Tal como se usa en el presente documento, los términos "fitonutricional" o "fitonutriente" se refiere a moléculas

naturalmente sintetizadas que se encuentran solo en vegetales que se producen para proteger las células de las plantas. Los fitonutrientes tienen principalmente agentes de eliminación de radicales libres, antioxidante y actividad de micronutrientes vital. Estas moléculas, suministradas a través de complementación dietética, se encuentran en tejidos de vegetales maduros y se concentran en su mayoría en recubrimientos de semillas y tejidos de frutas que rodean la semilla. En tejidos de mamíferos, estas moléculas, cuando se suministran en la dieta, son activas en la optimización de la bioquímica, inmunología y fisiología en el microentorno celular.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "extracto vegetal" y "extracto herbal" se usan indistintamente para referirse a fitoquímicos que se producen en tejidos vegetales y que pueden extraerse mediante agua, polares o disolventes de petróleo y que tienen algún grado de salud beneficiosa o actividad terapéutica. La mayoría de agentes herbales pueden ser tóxicos, especialmente cuando se concentran, pero son, en general, seguros cuando se utilizan en su modo más tradicional en tés y cataplasmas como "medicina popular para el tratamiento de una enfermedad y el fomento de una buena salud". Tal como se usa en el presente documento, la expresión "agente de tonificación del organismo herbal" se refiere a sustancias que se han observado por los inventores que reducen e invierten el daño en el tejido elástico y fibras de colágeno provocado por la edad o daños solares como se ha probado mediante la restauración de la turgencia de la piel y elasticidad que reduce eficazmente o elimina arrugas, flacidez, hiperpigmentación y la reversión de otros elementos no deseables de la pérdida del aspecto cosmético.

Los carbohidratos incluidos en el complemento dietético de la invención están disponibles a partir de una amplia diversidad de fuentes naturales y sintéticas tales como derivados de arbustos, árboles, plantas, levaduras, hongos, mohos, las encías, resinas, almidón y celulosa y fuentes de mucina naturales. Específicamente, algunas de las fuentes naturales incluyen: (a) exudados de arbusto o árbol que contiene acacia, karaya, tragacanto o gati; (b) gomas marinas que incluyen ágar, alginato o carragenano; (c) gomas de semillas que incluyen guar, de garrofin o psilio; (d) extractos vegetales que contienen pectinas o polimanaso acetilada; (e) derivados de almidón y celulosa tales como hetaalmidón, carboximetilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, celulosa oxidada; y gomas microbianas que contienen dextranos, xantano. Sin embargo, se debe reconocer que la composición de la invención no está prevista para limitarse por la fuente a partir de la cual se obtienen los respectivos carbohidratos.

Los sacáridos de la invención pueden encontrarse en la naturaleza como mono-, oligo- y/o polisacáridos. Por lo tanto, las composiciones de la invención pueden contener los sacáridos en sus formas monoméricas, oligoméricas y/o poliméricas. Para una lista de fuentes naturales conocidas de los sacáridos y sus usos, hagan referencia a la solicitud de patente de Estados Unidos n.º US2003072770.

Tal como se usa en el presente documento, el término "carbohidrato" puede usarse indistintamente con el término "sacárido", "polisacárido", "oligosacárido" y "azúcar" las definiciones de los cuales son bien conocidas por los expertos en la técnica de la química de carbohidratos. Aunque las composiciones de la invención están previstas para que incluyan al menos dos o más sacáridos esenciales, debe destacarse que los sacáridos pueden encontrarse en forma de mono-, oligo- y/o polisacáridos, por ejemplo, una composición que contiene goma tragacanto y goma guar se considerarán como que contienen ácido galacturónico, ácido siálico, manosa y galactosa. Por lo tanto, mediante el control de la cantidad de gomas particulares en un complemento dietético dado, uno puede controlar la cantidad de respectivos sacáridos en el complemento dietético.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "una mezcla de al menos dos formas de vitamina E" se usa para describir una mezcla de al menos dos formas de tocoferol seleccionadas entre tocoferoles alfa, beta, delta, épsilon, gamma, zeta, eta, xi1, xi2 y sigma, y tocotrienoles alfa, beta, delta y gama, así como combinaciones o derivados de los mismos. En una realización, "una mezcla de al menos dos formas de vitamina E" es una mezcla de al menos dos formas de tocoferol seleccionadas entre tocoferol alfa, beta, delta y gama. En otra realización, "una mezcla de al menos dos formas de vitamina E" es una mezcla de tocoferol alfa, beta, delta y gama. "Una mezcla de al menos dos formas de vitamina E" se puede obtener de VOTAECAPS, SA, España, de Henkel Corporation; o de Cognis Corporation (Kankakee, IL), por ejemplo. COVITOL® F-350M está comercialmente disponible en Cognis y contiene una fuente natural de tocoferol alfa con tocoferoles mezclados que se obtienen de aceites vegetales comestibles. La mezcla particular de tocoferoles incluida en la composición antioxidante de la presente invención se determina llevando a cabo una determinación de antioxidante de ORAC(o).

Las sales o derivados de tocoferoles incluyen sales farmacéuticamente aceptables tales como acetato, sulfato, succinato, nicotinato, alofanato, fosfato, quinona o derivados halogenados; ésteres; estereoisómeros; y similares. La invención abarca el uso de derivados de vitamina E en los que se pueden realizar sustituciones, adiciones u otras alteraciones en el anillo 6-cromanol y/o cadena lateral, con la condición de que los derivados mantengan su actividad antioxidante de una vitamina E. Por ejemplo, los tocoferoles y sus derivados pueden variar por el número y posición de grupos alquilo, enlaces dobles y otros sustituyentes y variaciones en el anillo o cadena lateral. Un "alquilo" es un grupo químico cíclico, de cadena lineal o ramificada que contiene solo carbono e hidrógeno, tal como metilo, butilo y octilo. Los grupos alquilo pueden estar o bien no sustituidos o sustituidos con uno o más sustituyentes, por ejemplo, halógeno, alcoxi, aciloxi, amino, hidroxilo, mercapto, carboxi o bencilo. Los grupos alquilo pueden ser saturados o insaturados en una o varias posiciones. Los grupos alquilo típicamente comprenderán de 1 a 8 carbonos, de 1 a 6 o de 1 a 4 átomos de carbono. Los tocoferoles adicionales pueden construirse mediante conjugación a la estructura de anillo o cadena lateral de diversos otros restos, tales como los que contienen oxígeno, nitrógeno, azufre y/o fósforo.

Los derivados de tocoferol también se pueden realizar modificando la longitud de la cadena lateral de la que se encuentra en los tocoferoles prototípicos tales como tocoferol alfa, beta, delta y gama. Los tocoferoles también pueden variar en estereoquímica y saturación de los enlaces en la estructura de anillo y cadena lateral.

5 Derivados de tocoferol adicionales, incluidos profármacos, se pueden realizar mediante conjugación de azúcares u otros restos a la cadena lateral o estructura de anillo. Tocoferoles mezclados incluyen sin limitación mezclas de estereoisómeros de un tocoferol individual (por ejemplo, estereoisómeros + y + de tocoferol alfa; (+/-) indica una mezcla racémica) o mezclas de tocoferoles estructuralmente distintos (por ejemplo, tocoferol alfa más gama).

10 Aunque la presente invención incluye los citados once sacáridos esenciales, debe destacarse que otras sacáridos, componentes nutricionales o compuestos biológicamente activos o inertes se pueden incluir en el complemento dietético de la invención. Otros compuestos nutricionales incluyen cualquiera uno o más de fitonutrientes, complejo de dioscórea, extractos vegetales, extractos herbales, partes de plantas, componentes herbales, vitaminas o minerales. Estos compuestos nutricionales se pueden añadir al complemento dietético de la invención o pueden proporcionarse por separado a un mamífero que está siendo administrado con el complemento dietético.

15 Por ejemplo, una persona que recibe la forma de dosificación de contiene gluconutrientes de la invención también puede recibir un fitonutriente o bien en la misma forma de dosificación o bien en una por separado. Compuestos inertes pueden incluir saborizantes, cargas, lubricantes, tampones, geles, aglutinantes, excipientes, portadores y/u otros tales compuestos que faciliten la formulación o administración del complemento dietético de la invención. Todas las composiciones de complemento dietético que contienen gluconutrientes de la invención, incluso aquellas que contienen compuestos adicionales, agentes u otras sustancias, se pueden obtener directamente de Mannatech, Inc. (Coppell, Tex.).

20 La presente invención incluye un procedimiento para medir directa y simultáneamente la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (PRAC) de una composición que incluye antioxidantes tanto hidrófobos como/o hidrófilos. El término "ORAC(o) se usa puesto que el ensayo mide la capacidad de los antioxidantes en desactivar radicales controlando directamente la desaparición de oxígeno en un ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno que mide directamente el contenido de oxígeno en una muestra (ORAC(o)). Los ensayos estándar de la industria actual como ORAC(fl) y ORAC( $\beta$ -PE), miden la capacidad antioxidante midiendo indirectamente la degradación de emisiones fluorescentes de un compuesto fluorescente (fluorescencia o  $\beta$ -ficoeritrina) cuando se exponen a radicales de oxígeno. Estos ensayos funcionan bien con antioxidantes hidrófilos, pero tienen una eficacia limitada en la medición de antioxidantes hidrófobos o mezclas de antioxidantes hidrófobos e hidrófilos. Además, a diferencias de los conocidos sistemas ORAC(fl) y ORAC( $\beta$ -PE), el ORAC(o) desvelado en el presente documento es adecuado para la simplificación y fabricación como un sensor desechable. El sistema es lo suficientemente robusto para permitir la fabricación de un sistema de oficina o incluso doméstico para la evaluación inmediata de la capacidad oxidativa de un usuario a partir de muestras biológicas.

35 Aparato ORAC(o). La FIG. 1 es una ilustración de un aparato antioxidante directo de ORAC(o) 10. El aparato 10 tiene, tal como se representa, tres componentes básicos: un sistema detector 12, un sistema fluido 14 y un sistema de procesador de datos 16, que pueden interconectarse para proporcionar captura de datos, control fluido y de muestras y procesamiento de datos. El sistema detector 12 tiene un sensor de oxígeno 18, que está en comunicación fluida con el sistema fluido 14 mediante uno o más conductos 20. El fluido que fluye a través del uno o más conductos 20 se controla usando una o más válvulas 22, que pueden controlarse manualmente y/o bajo el control del sistema procesador de datos 16. En funcionamiento, una muestra 24 entra en el sistema fluido y se dirige hacia el detector 18 y, a continuación, se suministra la captura de datos al almacenamiento de residuos 26. El sistema fluido 14 también puede incluir una o más soluciones 28 que se dirigen hacia el tránsito a través del sistema fluido 14 mediante bombas, mediante vacío o mediante presión, por ejemplo, gas inerte presurizado. Las soluciones 28 en el sistema fluido 14 se premezclará o equilibrará, en general, como para su uso en la presente invención puede, en general, incluir: agua, un disolvente, un detergente o mezcla de agua:detergente, un generador de radicales de oxígeno, una diana de oxidación, etc., y puede mezclarse en una cámara de mezclado 30 antes de su suministro a la cámara de detección de oxígeno 34. La elección del sistema fluido dependerá del grado de automatización deseado o escogido, como conocerán los expertos en la técnica. La muestra 24 puede premezclarse con la misma solución que se usa para calibrar el sensor de oxígeno 18 o puede incluir premezclarse en la cámara de mezclado 30.

50 Ejemplos de detectores de oxígeno 18 para su uso con la presente invención incluirán cualquier sensor de oxígeno disuelto que sea capaz de detectar oxígeno disuelto en presencia de un disolvente, agua y un detergente. Ejemplos de sensores de oxígeno disuelto incluyen, por ejemplo, sensor de oxígeno electroquímico, quimioluminiscente, de resonancia de plasmón superficial, infrarrojo, de acoplamiento capacitivo, de fibra óptica acoplada tinte o incluso hiperespectral. En un ejemplo específico, el sensor de oxígeno disuelto es un sensor de oxígeno biológico YSI 5300A (YSI, EE.UU.), un sensor SPREETA (Texas Instruments), un PASCO PS2108 (Pasco, EE.UU.) y similares. En un ejemplo, el sensor de oxígeno disuelto tiene las siguientes especificaciones: Intervalo de: 0-20 mg/l; Precisión:  $\pm 10\%$  de escala completa; Resolución: 0,01 mg/l; Velocidad de muestra máxima: 20 sps; Velocidad de muestra por defecto: 2 sps; Respuesta: 98 % en 60 segundos; Intervalo de temperatura: 0-50 °C; Compensación de temperatura: 10-40 °C; Cátodo: Platino; Ánodo: Ag/AgCl; Membrana: 1 ml de silicio y puede usarse junto con el software proporcionar por el fabricante, por ejemplo, Dissolved Oxygen EZ (Pasco, EE.UU.). El sistema también puede incluir

sensores de pH, ORP, conductividad o turbidez en comunicación fluida con el sistema de fluidos

En funcionamiento, el sistema ORAC(o) que se desvela en el presente documento se puede usar del siguiente modo: un usuario recoge una muestra y la disuelve en o con un kit de disolvente de ORAC(o) (seco o líquido). Un sensor de ORAC(o), por ejemplo, un sensor de oxígeno de resonancia de plasmón superficial portátil (véase, por ejemplo, sensor SPREETS de Texas Instruments) se expone a uno o más estándares de calibración y, a continuación, se expone a la muestra del usuario. El sensor de oxígeno se conecta a un procesador que evalúa la producción desde la superficie del detector sobre el sensor y proporciona al usuario una lectura. La lectura se puede mostrar en una pantalla, imprimirse y/o transmitirse a un procesador, memoria o similar. La muestra del usuario puede ser orina, saliva, lágrimas, secreciones de moco, sudor, sangre (productos sanguíneos), tejido, heces u otras muestras biológicas que se sospeche que tengan radicales de oxígeno. En un ejemplo, la muestra es una o más alientos (una o más inhalaciones y/o exhalaciones) que se recogen por un respirador, por ejemplo, un respirador cerrado. Los valores detectados por el sensor pueden incluso guardarse en una memoria (volátil, semipermanente o permanente) para su futura referencia o para su comparación con valores del pasado o del futuro para evaluar el estado oxidativo del usuario.

Los componentes básicos del ensayo de ORAC(o) para la actividad antioxidante de la presente invención aprovecha los procedimientos tipo ORAC existentes y son, por lo tanto, más fácilmente adaptables para su uso en laboratorios sin la necesidad de una formación extensiva, si la hay. En resumen, ORAC(o) usa un sensor de oxígeno, por ejemplo, un sensor de oxígeno en plasma sanguíneo o un sensor de oxígeno soluble para medir la actividad oxidante, por ejemplo, midiendo directamente las actividades relativas de una o más moléculas generadoras de radicales de oxígeno en la solución de muestra y un desactivador oxidativo (antioxidantes) como estándares. Cabe destacar que determinados agentes, por ejemplo, agentes de reducción o volátiles, pueden llevar a la absorción o producción de oxígeno en una solución en ausencia de una fuente de radicales, por ejemplo, APPH, puede afectar la cantidad de oxígeno en la solución. Mediante el uso de la presente invención el experto en la técnica puede diferenciar entre las actividades de desactivación de radicales y de desactivación de no radicales de muestras mediante, por ejemplo, la evaluación del comportamiento de la muestra en la solución antes de la adición del iniciador de radicales libres. Cabe destacar que tanto las actividades de desactivación de radicales como la desactivación de no radicales de las muestras sometidas a ensayo, tal como se determina mediante el uso de la presente invención, se refieren al estado oxidativo. Las actividades relativas del generador de radicales libres y el desactivador de radicales de oxígeno pueden titularse y/o medirse en el tiempo como con los procedimientos indirectos de ORAC(fl), ORAC(fl-lipo), ORAC( $\beta$ -PE) y similares.

La Figura 2 es un diagrama de flujo 50 se resume las etapas básicas del procedimiento de la presente invención. En la etapa 52, la sonda de oxígeno soluble se equilibra y/o calibra en presencia de una mezcla de disolvente:agua:detergente y se mide un valor basal. En un ejemplo el disolvente:agua:detergente es una mezcla de acetona:agua:Tween-20 en una relación de 1:1:1. En la etapa 54, una determinación del valor basal de la actividad antioxidante sirve como el control positivo y el valor basal para la comparación de la actividad antioxidante que usa, por ejemplo, Trolox® como el antioxidante. Una ventaja del Trolox® y moléculas relacionadas es que estos derivados de vitamina E son más estables de lote a lote, tienen menos variación de lotes y son sintéticos, proporcionando, de este modo, una concentración fiable de la actividad antioxidante. La mezcla en la etapa 54 se mezcla, en la etapa 56, con una diana de radical de oxígeno, por ejemplo, ácido linoleico antes de la adición del generador de radicales de oxígeno en la etapa 58. Se deja llevar a cabo el ensayo y, en la etapa 60, se calcula el área bajo la curva (AUC) midiendo la desaparición de oxígeno disuelto con el tiempo y el valor de la muestra almacenada. Ya sea en serie o en paralelo, se disuelve una muestra en la mezcla de disolvente:agua:detergente (etapa 66) seguido por la adición de la diana de radical de oxígeno en la etapa 68. En general, es común usar el mismo tipo de diana de radicales de oxígeno en las etapas 56 y 68 y el mismo tipo de generador de radicales de oxígeno en las etapas 58 y 70. En la etapa 72, se detecta el AUC para la muestra y se almacena el valor para la muestra. Ahora que se ha determinado el estándar y el AUC de la muestra, se normalizan los valores restando el AUC del blanco. El estándar normalizado y los valores del AUC de la muestra se usan, a continuación, para comparar y calcular el nivel de actividad antioxidante en la muestra.

La siguiente descripción se usa para ayudar a ilustrar la invención y no debe usarse para limitar su ámbito. El detergente Tween 20 puede ayudar en la dispersión de ácido linoleico. El ácido linoleico proporciona dobles enlaces por todo cuyo oxígeno puede absorberse. Trolox® es un antioxidante sintético que se usa como estándar interno. Los valores obtenidos a partir de todas las muestras se relacionan con los del Trolox®. La molécula generadora de radicales de oxígeno: clorhidrato de 2,2' azobis (2-amidinopropana) (AAPH) reacciona con oxígeno para crear radicales centrados en carbono. Los radicales generados por AAPH provocan la oxidación del ácido linoleico. Como resultado de la oxidación del ácido linoleico, los enlaces dobles del ácido linoleico se convierten en cetonas, enlazándose con moléculas de oxígeno en el radical centrado en carbono. La sonda de oxígeno toma mediciones de la velocidad a la que se retira el oxígeno de la cámara de reacción debido a la oxidación del ácido linoleico. El radical azo puede reaccionar directamente con ácido linoleico, provocando la formación de un radical de ácido linoleico. El radical de ácido linoleico reacciona, a continuación con el oxígeno presente en la cámara de reacción para formar una cetona. Mediante cualquier otro mecanismo propuesto, se consume oxígeno debido a la oxidación del ácido linoleico. El antioxidante ralentiza el consumo de oxígeno en la cámara de reacción disuadiendo la oxidación de ácido linoleico. El cálculo del área bajo la curva para el oxígeno disuelto frente al gráfico de tiempo proporciona una medición de la capacidad antioxidante de la muestra como se ha demostrado por su capacidad en ralentizar la

oxidación del ácido linoleico.

Los generadores de radicales de oxígeno. Los generadores de radicales azo están presentes en el ensayo ORAC(o) de la presente invención a una concentración conocida para generar radicales para mediciones de la actividad antioxidante. Los iniciadores azo incluyen, por ejemplo, diclorhidrato de 2,2'-azobis[2-(5-metil-2-imidazolin-2-il)propano], diclorhidrato de 2,2' azobis (2-amidinopropano) (AAPH), diclorhidrato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)[2-(N-estearil)amidinopropano] (SA-1), diclorhidrato de 2,2'-azo(2-(2-imidiazolin-2-il)-propani)-[2-[2-(4-n-octil)imidazolin-2-il]-propanoe] (C-8), 2,2'-azobis(4-metoxi-2,4-dimetilvaleronitrilo) (MeO-AMVN), 2,2'-azobis(2,4-dimetilvaleronitrili) (AMVN), azo-bis-isobutilnitrilo, 2,2'-azobis (2-metilpropionati) (DAMP) y 2,2'-azobis-(2-amidinopropano).

Por ejemplo, el generador de radicales de clorhidrato de 2,2' azobis (2-amidinopropano) (AAPH) se descompone en nitrógeno molecular y dos radicales de carbono. Los radicales de carbono se combinan para producir productos estables o reaccionar con oxígeno molecular para proporcionar radicales de peroxilo. La semivida de AAPH es de aproximadamente 175 horas (37 °C a pH neutro). Por lo tanto, la tasa de generación de radicales libres es esencialmente constante durante las primeras varias horas en la solución. Se usa AAPH a menudo para la peroxidación lipídica en dispersiones acuosas de ácidos grasos, como tal; se puede usar solo o en combinación con un generador de radicales lipófilo y/o lipófilo. El sistema de disolvente que se desvela en el presente documento permite el uso de o bien generadores tanto lipófilos y/o como lipófilos según el aparato mide el oxígeno total en la muestra.

Sistema de disolvente. El sistema de disolvente para el ORAC(o) es un sistema de tres partes que incluye un disolvente, una fase acuosa y un detergente. Por ejemplo, el disolvente puede ser un disolvente orgánico seleccionado entre alcoholes, aminas, ésteres, éteres de glicol, glicoles, terpenos y/o mezclas de los mismos. El sistema de disolvente orgánico se formula para que sea inferior al 50 %, aproximadamente el 30 o 33 por ciento, inferior al 20 % y, en algunos casos, inferior al 10 % de componentes de disolventes.

En una realización el disolvente es acetona, que puede ser desde aproximadamente el 10 y el 90 por ciento en vol/vol del sistema de disolvente ORAC(o), la porción acuosa desde entre aproximadamente 10 y 90 por ciento en vol/vol del sistema de disolvente ORAC(o) y el detergente del 0,001 al 90 % del sistema de disolvente. Por ejemplo, el sistema de disolvente ORAC(o) puede ser un tercio de agua, un tercio de detergente ("un tercio" de disolvente) y la muestra a una concentración de, por ejemplo, 1 mg/ml. A continuación, se realizan las diluciones usando el mismo disolvente. El detergente puede ser un detergente no iónico tal como TWEEN®, (es decir, TWEEN®20), BRIJ®, o TRITON®; un detergente zwitteriónico tal como CHAPS®; un agente catiónico; un detergente aniónico tal como colato, deoxicolato, dodecilsulfato de sodio o TWEEN®-80; o un tensioactivo. La relación de agua con respecto a acetona a detergente puede ser de entre aproximadamente el 5 % al 90 % al 90 % al 5 %, respectivamente. A diferencia de ORAC(fl), que usa un sistema de dos componentes que usa una mitad de acetona y una mitad de agua, los detergentes del sistema de disolvente de ORAC(o) permiten una medición directa de oxígeno a partir de la muestra total. Una variante que el ORAC(fl-lipo) que usa una  $\beta$ -ciclodextrina aleatoriamente metilada.

Usos para el ensayo de ORAC(o): El ensayo ORAC(o) puede usarse para medir la actividad antioxidante total de muestras biológicas, para la evaluación de componentes para los complementos nutricionales de la presente invención e incluso para someter a ensayo y evaluar el competidor y/o el complemento dietético final de la presente invención. Para su uso en la evaluación de muestras biológicas, estas pueden ser, por ejemplo, suero, fracción de suero soluble en lípidos, fracción de suero soluble en agua, orina, fracción de orina soluble en lípidos, fracción de orina soluble en agua, fracción de LDL, homogeneizados tisulares, control de calidad de complementos antioxidantes, productos alimentario o conservantes, desarrollo de nuevos complementos antioxidantes, desarrollo de nuevos productos alimentarios, nuevos conservantes o nuevas terapias antioxidantes, control de calidad de fabricación y procesamiento de alimentos, evaluación de la actividad antioxidante de plantas o control de la actividad antioxidante de productos cosméticos, por ejemplo.

**Ejemplo 1:** Comparación de actividad antioxidante mediante el uso de ensayos de ORAC(fl) y ORAC(o).

Se analizaron ingredientes para una composición antioxidante para su actividad antioxidante usando un procedimiento de capacidad de absorción de radicales de oxígeno de la técnica anterior que mide la fluorescencia (ORAC(fl)) y mediante el uso del procedimiento de la presente invención que mide el oxígeno disuelto (ORAC(o)). La actividad antioxidante de un producto es su capacidad en proteger el sistema de los daños causados por radicales de peroxilo.

Procedimiento de técnica anterior que miden actividad antioxidante para su comparación. Para el ensayo de ORAC(fl), se siguió el procedimiento de Ou y col., (Ou, B., Hampsch-Woodill, M. and Prior, R.L., J. Agric. Food Chem. 2001,49, 4619-4626). Las diferencias a partir del procedimiento de Ou tal como se ha publicado incluían la velocidad del agitador orbital (ou, 400 rpm; en el presente documento, 280 rpm) y la velocidad de centrifugación (Ou, 14.000 rpm, 15 min; en el presente documento, 3200 rpm, 15 min y la longitud del ensayo (Ou, 30 min; en el presente documento, 100 min). Fluoresceína, sal de sodio, se obtuvo a partir de Aldrich (Milwaukee, WI). Para el procedimiento de Ou, se añade una cantidad estándar de fluorescencia a un producto antioxidante que está siendo sometido a ensayo y se mide el nivel de inicio de fluorescencia. Se añade un iniciador de radicales libres y se miden

el tiempo y el grado de desaparición de fluorescencia. Trolox®, es un Ácido 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico, es un derivado permeable de célula, soluble en agua de la vitamina E con potentes propiedades antioxidantes. Trolox® previene el estrés oxidativo mediado por peroxinitrito y la apoptosis en timocitos de rata y es un antioxidante sintético que es consistente de lote a lote y que se usa como el estándar y se lleva a cabo para su comparación con cada muestra. Se usa un blanco (control) en los cálculos del valor de ORAC(o) para cada muestra se puede incluir en cada tirada. Se ilustra la fluorescencia frente a tiempo. Se sustrae el blanco (control) de cada curva. El área bajo la curva neto del antioxidante se compara con el área bajo la curva neto de Trolox®. Cuando mayor sea el área bajo la curva neta, mayor es la capacidad antioxidante de las moléculas en la muestra. Todos los análisis de ORAC(fl) se realizaron con un analizador centrífugo de COBAS FARA II (Roche Diagnostic System Inc., Branchburg, NJ; longitud de onda de excitación = 493 nm y filtro de emisión = 515 nm ). Se proporcionan los resultados en micromoles de equivalentes de Trolox® por gramo de muestra.

Procedimiento de medición de actividad antioxidante. En funcionamiento, el ensayo de ORAC(o) de la presente invención se usó para evaluar las composiciones antioxidantes, combinaciones y similares de soluciones frente a una molécula diana (ácido linoleico) con oxígeno presente en equilibrio con el aire. Se añade un iniciador de radicales libres y se mide el tiempo que lleva en desaparecer el oxígeno, proporcionando la velocidad de desaparición. Se usa Trolox® como el estándar y se lleva a cabo un blanco como control. Se ilustra la cantidad de oxígeno disuelto frente a tiempo permitiendo la comparación directa de las áreas bajo la curva netas. Un procedimiento detallado es el siguiente: Tamponadores (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (F.W. 174,2), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (FW 120,0)) se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO). Ácido linoleico al 99 %, Trolox® (Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico al 97 %, TWEEN® 20 y clorhidrato de 2,2'-azobis (2-metilpropionati) (AAPH) al 97 %, se obtuvieron a partir de Aldrich (Milwaukee, WI). Se obtuvo acetona de grado HPLC a partir de Fisher (Hampton, NH). Se obtuvo un medidor de oxígeno biológico YSI 5300A a partir de (Yellow Springs, Ohio) y se usó según las indicaciones del fabricante.

Procedimiento ORAC(o). Se usaron las siguientes soluciones de reserva. Preparación de tampón fosfato (75 mM, pH 7,4 ); 750 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (F.W. 174,2); Peso 65,33 g en 500 ml de matraz volumétrico y añadir dH<sub>2</sub>O a la marca. La concentración es de 750 mM. Almacenar 750 mM de solución de reserva de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en un refrigerador (de 2 a 8 °C) equipado con un termómetro calibrado. La temperatura diana es de 4 °C. 750 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (FW 120,0); Peso 45,00 g en 500 ml de matraz volumétrico y añadir dH<sub>2</sub>O a la marca. La concentración es de 750 mM. Almacenar 750 mM de solución de reserva de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en un refrigerador (de 2 a 8 °C) equipado con un termómetro calibrado. La temperatura diana es de 4 °C. Mezclar 40 ml de 750 mM de solución de reserva de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 10 ml de 750 mM de solución de reserva de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (relación de 4 a 1). Esto proporcionará 50 ml de tampón de solución de reserva de ORAC. Almacenar solución de reserva de en un refrigerador (de 2 a 8 °C) equipado con un termómetro calibrado. La temperatura diana es de 4 °C. Diluir la mezcla con dH<sub>2</sub>O (1:9) para hacer la solución de trabajo de tampón de ORAC y medir el pH. Debe ser de 7,4. Mantener cubierta a temperatura ambiente hasta que esté lista para su uso.

Preparación de Tween. Pesar 10 g de Tween 20 y añadir 90 g de agua desionizada. Cubrir y agitar la mezcla durante la noche. Se mantiene la solución de reserva de Tween durante una semana. Mantener sobre un banco.

Preparación de disolvente. Mezclar 25 ml de acetona, 25 ml de agua desionizada y 25 ml de Tween 20. Usar este disolvente para preparar las muestras. Antes de realizar la tirada: la sonda debe inspeccionarse por si tuviera algún daño teniendo particular atención en la membrana, y reemplazarse si fuera necesario. Las sondas deben almacenarse con las puntas en agua desionizada. Solo debe usarse una sonda y una cámara de reacción para este ensayo. Llevar a cabo un blanco y un Trolox® (a 10 µg/ml o 0,03995 µmol/ml) cada 8 horas. Las muestras deben someterse a una concentración de 10 µg/ml. La concentración de muestra y concentración de Trolox® debe ser la misma:

Las diluciones se preparan pesando 1 mg de muestra y añadiendo 1 ml de disolvente para realizar la extracción inicial. Agitar durante una hora, colocar 0,5 ml de la solución de extracción inicial en un vial de centelleo de vidrio y, a continuación, añadir 4,5 ml de disolvente, fabricando la primera dilución. Agitar con formación de vórtice durante aproximadamente 30 segundos. Su concentración es de 0,1 mg/ml o 100 ppm. Tomar 0,5 ml de la primera dilución, poner otro vial de centelleo de vidrio y, a continuación, añadir 4,5 ml de disolvente, agitar con formación de vórtice durante 30 segundos, para producir una concentración de 0,01 mg/ml o 10 ppm. Tomar 0,5 ml de la muestra de vial y poner otro vial de centelleo de vidrio y, a continuación, añadir 4,5 ml de disolvente, agitar con formación de vórtice durante 30 segundos, para producir una concentración de 0,01 mg/ml o 10 ppm. Los viales se colocan en un refrigerador a 4 °C. En un baño de agua a 37 °C se deja descongelar el ácido linoleico y preparar la solución de ácido linoleico (con luz mínima) añadiendo 0,18 ml de solución de reserva de Tween, 0,18 ml de tampón y 0,44 ml de agua desionizada a 70,8 mg de ácido linoleico. Mantener el tubo de solución envuelto en aluminio. Refrescar la solución de ácido linoleico cada 8 horas. Para preparar el generador de radicales de oxígeno, pesar 67,8 mg de AAPH y disolver en 0,9 ml de tampón. Mantener el APPH refrigerado, Se puede usar hasta ocho horas. Agitar durante 1 hora. La solución de Trolox® debe mantenerse refrigerada en todo momento. Para empezar a medir la actividad antioxidante, añadir 1,86 ml de tampón en cada recipiente de reacción, 2,36 ml de agua, a los viales de centelleo a 37 °C y dejar tres minutos de agitación mientras que la matriz de reacción vuelve a su temperatura. Añadir 0,284 ml de la muestra y colocar la punta de la sonda en el vaso sin tocar la solución de reacción y dejar un minuto de agitación. Las mediciones se toman en mejor en un entorno con luz reducida.

Después de la recogida de datos, retirar la sonda de la cámara, añadir 0,357 ml cada una de solución de ácido



linoleico y reemplazar el extremo de la sonda en la cámara inmediatamente. Añadir 0,357 ml de solución de AAPH y colocar la sonda en el tubo de solución cuidadosamente pero rápidamente de modo que nos y dejan burbujas en el área de reacción y no hay solución en el borde de desbordamiento sobre la funda de la sonda. A continuación, colocar la sonda en la solución y tomar una lectura. Capturar los datos y calcular la actividad antioxidante.

5 Se prepararon muestra a una concentración de 1 mg/ml en "un tercio de disolvente" (también denominado como el sistema de disolvente de ORAC(o)). "Un tercio" de disolvente son partes iguales de agua, acetona y una solución de TWEEN®20 diluida 1:9 con agua. Se agitaron las muestras durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador orbital a 280 rpm. La solución de muestra estuvo lista para su análisis después de una dilución adicional (en general, a 10 µg/ml) con "un tercio" de disolvente. Se usó también "un tercio" de disolvente como el blanco.

10 Se llevó a cabo el ensayo ORAC(o) usando el metro de oxígeno biológico YSI 5300A. Se preparó ácido linoleico añadiendo 0,18 ml de 75 mM de tampón de fosfato (pH 7,4), 0,18 ml de 10 por ciento en peso de solución de reserva de TWEEN®20 y

15 0,44 ml de agua desionizada a 70,8 mg de ácido linoleico. Se preparó AAPH añadiendo 0,9 ml de tampón a 67,8 ml de AAPH. En el volumen de reacción final (5,218 ml), se usó ácido linoleico (21,59 mM) como el ataque de radicales libres diana y se usó AAPH (19,00 mM) como un generador de radicales de peroxilo. Se usó Trolox® (a 10 µg/ml) como estándar. Se tomaron las lecturas cada segundo hasta que se observó una lectura de cero.

La fórmula para calcular el valor de ORAC(o) (electrodo específico de oxígeno de Capacidad de absorbanza de radicales de oxígeno) es:

$$\text{ORAC(o)} = \frac{\frac{\text{AUC}_{\text{SMP}} - \text{AUC}_{\text{BLNK}}}{\text{AUC}_{\text{TLRX}} - \text{AUC}_{\text{BLNK}}} \times 1000 \text{ (mg/gr)} \times [\text{TRLX } (\mu\text{mol/ml})]}{[\text{SMP (mg/ml)}]}$$

20 Como alternativa, el ORAC(o) puede calcularse en mililitros cuando se evalúa una fórmula líquida. Este calcula proporciona una cantidad conocida como micromoles de equivalentes de Trolox® por gramo de muestra. Un valor de ORAC(o) negativo refleja menos actividad de desactivación de radicales que la obtenida con un blanco lo que indica que una composición es pro-oxidante, es decir, un agente que promueve la oxidación, en lugar de actuar como antioxidante. Un supuesto del ensayo de ORAC(o) es que el oxígeno no está siendo absorbido o liberado por la muestra, sin embargo, cualquier efecto del nivel de oxígeno de la muestra puede evaluarse y usarse para compensarse en el valor antioxidante calculado.

25 Comparación de parámetro de ensayo de ORAC(o) y ORAC(fl). Las ventajas del ORAC(o) en comparación con el ORAC(fl) se midieron en una medición directa frente a indirecta del potencial antioxidante. El ORAC(fl) es un procedimiento de detección de radicales libres indirecto puesto que se basa en el supuesto de que la fluorescencia (molécula diana) es el único componente fluorescente que se mide. Sin embargo, muchos compuestos antioxidantes tienen fluorescencia naturalmente (por ejemplo, arándanos); y combinaciones de estos compuestos a partir de reacciones radical-radical también tienen fluorescencia. La fluorescencia a partir de la muestra, por lo tanto, puede desviar los resultados de un ensayo basado en fluorescencia. El procedimiento ORAC(o), por otra parte, es una medición directa de la absorción de oxígeno, es decir, una medición directa de la desaparición de oxígeno en radicales libres. Este procedimiento de medición de la capacidad antioxidante no depende de si el oxígeno está unido o no a componente solubles en agua o en lípidos. En la Tabla 1 se proporciona una comparación de los parámetros de ensayo de los procedimientos de ORAC(fl) y ORAC(o).

**Tabla 1:** Comparación de los parámetros de ensayo de ORAC(fl) y ORAC(o).

Parámetros de ensayo durante ensayo	ORAC(fl)	ORAC(o)
Temperatura	37 °C	37 °C
Concentración de AAPH	1,28 x 10 <sup>-2</sup> M en tampón de fosfato	19,00 mM en tampón de fosfato
Concentración de molécula diana	fluoresceína, 43,8 nM en tampón de fosfato	21,59 mM en ácido linoleico, en mezcla de TWEEN® 20 al 10 %, tampón y agua (.18 ml, .18 ml, .44 ml)
Concentración de la muestra	inicialmente a 500 mg en 20 ml, sobrenadantes diluidos a 10 µg/ml con tampón	1 mg/ml inicialmente, diluido a 10 µg/ml
Disolvente de muestra	acetona/agua, 50/50 v/v diluciones en tampón de fosfato	agua/acetona/10 % en peso de TWEEN® 20, diluciones v/v/v ("un tercio" de disolvente) en "un tercio" de disolvente

(continuación)

Parámetros de ensayo durante ensayo	ORAC(fl)	ORAC(o)
Tampón para ensayo, concentración	fosfato 75 mM, pH 7,4	fosfato 75 mM, pH 7,4
Volumen de ensayo final	400 µl	5,218 ml
Blanco (control)	tampón,	"un tercio" de disolvente
Estándar	Trolox® 62,5 µM en tampón	Trolox® a 10 µg/ml (38,755 µM) en "un tercio" de disolvente
Procedimiento de medición de capacidad antioxidante de la muestra	la fluoresceína produce una disminución en la fluorescencia según se oxida por los radicales, el antioxidante protege y retrasa la disminución	el oxígeno se toma por el iniciador de radicales y por los radicales de carbono de ácido linoleico; el antioxidante protege y disminuye la absorción de oxígeno

Una ventaja distinta de la presente invención es que el usuario no necesita aprender nuevas técnicas o adquirir equipamiento para incorporar el presente aparato y procedimiento en su entorno de laboratorio. Por ejemplo, cuando se mide la saturación de una muestra, la presente invención utiliza muchos de los mismos tampones, condiciones, etapas de extracción y/o separación que en un sistema de medición indirecta bien establecido desarrollado por, por ejemplo, Ou, y col. Ou, y col., se prepararon las muestras en acetona/agua (50:50, v/v) a una concentración de 500 mg en 20 ml, se giraron sobre un agitador rotatorio a 400 rpm durante 1 hora, se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 minutos y se diluyeron con 75 mM de tampón de fosfato de potasio a pH 7,4 (Ou, y col., Development and Validation of Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay for Lipophilic Antioxidants Using Randomly Methylated-p-Cyclodextrin as the Solubility Enhancer, J. Agric. Food Chem. 2002, 50, 1815-1821). Los presentes inventores hallaron que gran parte de una muestra de ensayo no se convertiría en solución con las condiciones de Ou (condiciones de ORAC(fl)), los componentes más solubles desplazan los componentes menos solubles. Por consiguiente, solo esa porción de la muestra que se solubilizó con las condiciones de ORAC(fl) se incluyeron en la muestra de ORAC(fl) y la medición. Por lo tanto, una solución de sobrenadante realizada según el procedimiento de ORAC(fl) para su análisis no es probable que sea representativa de la actividad antioxidante total de la muestra real. Puesto que una solución de una muestra en el tampón de ORAC(fl) no siempre refleja el contenido de la misma, los resultados pueden desviarse mediante el uso de ORAC(fl).

El problema con la disolución de la muestra se reconoció y se observó una falta de contribución de tocoferoles mezclado con respecto a la medición de antioxidante llevada a cabo en una mezcla de quercetina y tocoferoles mezclados cuando se usó ORAC(fl). Como se muestra en la FIG. 7, mediante el uso del sistema ORAC(o), se halló que el efecto antioxidante de la combinación de quercetina a 5 µg/ml y tocoferoles mezclados a 5 µg/ml en comparación con cada ingrediente por separado a 10 µg/ml. En cambio, el sistema de ORAC(fl) indirecto no muestra ningún efecto adicional desde la misma combinación más allá del valor para la quercetina sola (véase, FIG. 11). La falta de actividad de tal combinación con tocoferoles mezclados y los problemas de saturación están ausentes en el procedimiento ORAC(o) puesto que la concentración de la muestra está más diluida y puesto que el disolvente para la muestra contiene acetona, agua y un detergente para solubilizar todos los componentes de una muestra. La presencia de TWEEN®20 en el disolvente para la muestra representaba la detección de actividad a partir de tocoferoles mezclados. Como control para la actividad de Trolox®, la FIG. 7 muestra la quercetina a 5 µg/ml y tocoferoles mezclados a 5 µg/ml en comparación con cada ingrediente por separado a 10 µg/ml pero también incluye el control de Trolox® y demuestra la capacidad de ORAC(o) en detectar el nivel de radicales de oxígeno que permanecen en la muestra con el tiempo.

El ORAC(o) proporciona ahorros significativos en comparación con el ORAC(fl) (circa automatizado 250.000 \$; circa no automatizado 50.000 \$). En cambio, el aparato ORAC(o) que se desvela en el presente documento saca provecho de los sistemas de oxígeno existentes que pueden miniaturizarse fácilmente y/o automatizarse que pueden desarrollarse para su venta para clínicas o incluso su uso doméstico a una fracción de costes de sistemas de detección fluorimétricos más grandes. La validación, como se realizó por las directrices de la Asociación de químicos analíticos oficiales (AOAC) para una única validación de laboratorio, proporcionó los resultados en las Tablas 2, 3 y 4.

**Tabla 2.** Día 5 Ensayo para precisión (Repetibilidad)

Área bajo la curva (AUC)	
Día 1	202,655447939563
Día 2	212,901122995373
Día 3	187,01466464995
Día 4	202,856617129109

(continuación)

	Área bajo la curva (AUC)
Día 5 (2º Analista)	213,124092629655
Día 5 Mediana	203,710389068730
Desviación estándar	10,649840914564
Desviación estándar relativa	5,23 %
HORRAT	1,981060606061

Los valores para cada día son un promedio de 3 realizaciones de la muestra de quercetina a una concentración de 10 µg/ml. El valor HORRAT es la relación entre los valores RSD<sub>R</sub> observados y los valores RSD<sub>R</sub> predichos por la ecuación de Horwitz conocida por los expertos en la materia y se entiende como una indicación de la aceptabilidad de un procedimiento con respecto a su precisión. En un estudio de rendimiento de laboratorio único, una serie de relaciones de HORRAT entre 0,5 y 2,0 indican una precisión aceptable de un procedimiento. El valor de HORRAT para el ensayo del día 5 es de 1,98. En la Tabla 3 se proporciona una determinación del intervalo analítico como un intervalo lineal.

**Tabla 3.** Determinación de intervalo analítico

Muestra (µg/ml)	Área bajo la curva
1	124,567114093960
10	209,388111888112
100	693,611111111111
500	2327,96518987343
1000	2870,09540636041

10  $y = 2,8335x + 332,16$ ;  $R^2 = 0,9231$  para gráfico 1-1000  
 $y = 4,3353x + 176,66$ ;  $R^2 = 0,9967$  para gráfico 0-500

La integridad lineal parece disminuir según la concentración de la muestra se acerca a 1000 µg/ml. Con la determinación del intervalo analítico como un intervalo lineal, se determina el valor del área bajo la curva de concentraciones variables de hasta 500 µg/ml. La Tabla 4 proporciona resultados de precisión de resultados de un único día.

**Tabla 4.** Ensayo de un único día para precisión (Repetibilidad)

	Área bajo la curva
Realización 1	207,369402985075
Realización 2	198,18118466899
Realización 3	205,035211267606
Realización 4	201,586572438162
Realización 5	202,110714285714
Realización 5 Mediana	202,856617129109
Desviación estándar	3,505016471434
Desviación estándar relativa	1,73 %
HORRAT	0,654480870834

El ensayo de un único día implicó 5 realizaciones por separado de la muestra de quercetina a una concentración de 10 µg/ml. El valor HORRAT de la Tabla 4 para el procedimiento ORAC(o) es de 0,65448. El ensayo ORAC(o) se usó para optimizar las relaciones de los ingredientes en una composición antioxidante como se establece en el Ejemplo 2. Una realización de la composición tiene relaciones de peso de quercetina, 49,18 %; tocoferoles mezclados, 32,79 %; extracto de piel de uva, 9,84 %; extracto de té verde, 6,56 %; y ciruela, 1,64 tienen un valor antioxidante usando el ORAC(o) de 17.254 micromoles de equivalentes de Trolox® por gramo. La misma composición proporcionó un valor antioxidante usando el ORAC(fl) de 5.281 micromoles de equivalentes de Trolox® por gramo. Estos datos demuestran que los procedimientos de ORAC(o) y ORAC(fl) de medición de la actividad antioxidante difieren en los resultados obtenidos debido a las limitaciones del procedimiento de ORAC(fl) indirecto.

**Ejemplo 2:** Una composición antioxidante sinérgica.

De acuerdo con el complemento dietético de la presente invención, se combinaron cinco ingredientes en una composición antioxidante, cada una de las cuales es prominente en la dieta de gente con edades duraderas de regiones de todo el mundo. Los presentes inventores seleccionaron ingredientes basándose en una exhaustiva

investigación de las dietas en áreas conocidas por su longevidad. Los presentes inventores reconocieron que las dietas en estas regiones eran ricas en flavonoles y tocoferoles. Se reconoció adicionalmente por los inventores que determinados compuestos naturales interactúan favorablemente con moléculas que reactivan su actividad antioxidante, por ejemplo, la vitamina C. De hecho, profundas investigaciones apoyan el papel de la vitamina C en la regeneración de, por ejemplo,  $\alpha$ -tocoferol (Pizzorno and Murray, Textbook of Natural Medicine, 1999 , 2ª Ed. Nueva York, Churchill Livingston).

Según esta investigación, los inventores combinaron extractos aislados y purificados de fuentes naturales y otras que incluyen altos porcentajes de compuestos biodisponibles de las diversas regiones de la gente longeva en la formulación. En un ejemplo de la presente invención, se seleccionaron los siguientes ingredientes básicos: flavonoles, tocoferoles mezclados, extracto de piel de uva, extracto de té verde y ciruela son prominentes en la dieta de gente de la región de los Andes de Vilcabamba en Ecuador, las tierras de Huza en la cordillera de Karakoram en Cachemira o en Abkhazia en el Estado de Georgia de la antigua USSR, por ejemplo, tal como se cita en Leaf A., Launois J. "A Scientist Visits Some of the World's Oldest People," National Geographic. 1973 January; of the Italian island of Sardinia (Koenig R. "Sardinia's Mysterious Male Methuselahs," Science. 2001, 16 de marzo) y de Australia.

Las composiciones de la presente invención demostraron una actividad antioxidante sinérgica. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, los diversos ingredientes de la composición antioxidante tienen actividad de protección del citosol intracelular, las membranas celulares y el fluido extracelular de modo que el organismo está protegido en su totalidad. El componente de ciruela es alto en, por ejemplo, contenido de vitamina C, que puede llevar a la célula, es hidrófilo y está disponible para proteger el citosol; el extracto de piel de uva y el extracto de té verde son hidrófilos, no pueden entrar en la células y están disponibles para proteger el fluido extracelular; y los tocoferoles mezclados son lipófilos y junto con los flavonoles (por ejemplo, quercetina), que son tanto hidrófilos como lipófilos, protegen las membranas. Además, cualquier fibra que esté incluida en la dieta, o incluso en el complemento dietético mismo, pueden proporcionar un vehículo adecuado para su eliminación.

Componentes de la composición antioxidante sinérgica. Con la disponibilidad del aparato de ORAC(o) y los procedimientos de la presente invención, los presentes inventores fueron capaces de medir la actividad antioxidante total de la combinación de antioxidantes tanto lipófilos como lipófilos y otros agentes que ayudan a potenciar la actividad antioxidante de estos agentes, por ejemplo, vitamina C y similares. Mediante el uso del sistema ORAC(o), se desarrolló una composición antioxidante que tiene actividad sinérgica que incluye flavonoides, por ejemplo, quercetina, una mezcla de al menos dos formas de vitamina E y, opcionalmente, extracto de piel de uva, extracto de té verde y ciruela australiana. El sinergismo se observa particularmente en una relación de peso de quercetina con respecto a la mezcla de formas de vitamina E de 40/60 a 90/10 %. Una realización de la composición incluye las siguientes relaciones de peso: quercetina, 49,18 %; tocoferoles mezclados, 32,79 %; extracto de piel de uva, 9,84 %; extracto de té verde, 6,56 %; y ciruela, 1,64 %.

La FIG. 6 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo ORAC(o) que compara quercetina, tocoferoles mezclados y mezcla de tocoferoles y quercetina y el estándar antioxidante sintético: Trolox® (Hoffman-La Roche).

Flavonoides tales como quercetina. El flavonoide de la composición puede ser una flavona, un flavonol, una isoflavona, un isoflavonol, un análogo de los mismos, una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos o una mezcla de los mismos. Ejemplos de flavonol incluyen quercetina, caemferol o miricetina. El flavonoide particular o análogo de flavonoide o sal incluido en la composición se determina realización una determinación antioxidante de ORAC(o). Una actividad dentro del 80 % por ciento de quercetina se contempla que proporciona un análogo. Haciendo referencia a un flavonoide, en particular, quercetina, también está previsto referirse a la aglicón o glucósido del mismo en el que el azúcar es arabinosa, ramnosa, galactosa o glucosa, por ejemplo. El glucósido de ramnosa de la quercetina es conocido como rutin o quercetrín y el glucósido de ramnosa de miricetina se conoce como miricitrín. Los análogos de la quercetina incluyen aquellos compuestos que comprenden un grupo sustituyente distinto de un grupo -OH en una o más de las posiciones 3, 5, 7, 3' y 4'. Otros grupos sustituyentes incluyen: alquilo inferior a 5 átomos de carbono, acetilo, sulfilo o malonilo. Para análogos de quercetina, solo una o dos de las posiciones se sustituye con cualquiera distinto de grupos -OH.

Los flavonoides tales como quercetina se sintetizan fácilmente *in vitro*. Sin embargo, los flavonoides (incluida quercetina) están presentes y pueden aislarse y purificarse de, por ejemplo, alimentos de origen natural, en particular, frutas y verduras, tales como manzanas, peras, uvas, cebollas, vino tinto, pimientos morrones, grosellas rojas, grosellas negras, limones, cerezas, arándanos, grosellas silvestres, tomates, aceitunas, rábanos, colinabo, rábano picante, patatas y espárragos. La quercetina puede obtenerse de Pharmline (Florina, Nueva York).

Ciruela: La ciruela australiana (*Terminalia ferdinandiana*) contiene aproximadamente un 5 % de vitamina C y una variedad de ingredientes como se ha demostrado por un cromatograma de HPLC (datos no mostrados). Estos ingredientes se cree que incluyen flavonas y flavonoides. El cromatograma de HPLC es de una columna C<sub>18</sub> de fase inversa usando un gradiente escalonado de 0,1 % de ácido trifluoroacético y 100 % de metanol, a un caudal de 1 ml/min usando una muestra de metanol y polvo de ciruela extraída con agua. Las condiciones se desarrollaron para separar flavonoides y separar vitamina C. Se midió la absorbancia a 245 nm.

Se retiran la pulpa y la piel de una ciruela de la semilla del fruto y se convierten en una suspensión en agua. La

suspensión se liofiliza y se tritura. Para las composiciones antioxidantes del presente documento, el material liofilizado se pesa en la cantidad deseada. La ciruela está presente en la composición de la presente invención en una cantidad del 0 % al 87,9 % o, en otra relación, aproximadamente el 2 % en peso.

5 Extracto de piel de uva. Se hace extracto de piel de uva a partir de pieles de uva y contiene un 30-82 % de polifenoles y puede obtenerse de Polyphenolics, Medra, CA; Hunan Kinglong, Bio-Resource Co. Ltd, Changsha Economic Development Zone, China; o de Pharmline, Florida, Nueva York.

Extracto de té verde. El extracto de té verde es un extracto de las hojas de *Camellia sinensis*, contiene un 35-95 % de polifenoles y puede obtenerse de Amax NutraSource Inc., Eugene, OR; Blue California, Rancho Santa Margarita, OR, CA; o de PL Thomas & Co., Morristown, N.J.

10 Otros ingredientes. Las composiciones antioxidantes de la presente invención pueden incluir uno o más, portador no tóxico, farmacéuticamente aceptable tal como lactosa, almidón, sacarosa, glucosa, metilcelulosa, estearato de magnesio, fosfato dicálcico, sulfato de calcio, manitol, sorbitol, ciclodextrina, derivados de ciclodextrina o similares. Mediante el uso de uno o más portadores se pueden formular fácilmente cápsulas o comprimidos y pueden fabricarse fácilmente para tragar o masticar. Los comprimidos pueden contener portadores adecuados, aglutinantes, lubricantes, diluyentes, agentes desintegrantes, agentes colorantes, agentes aromatizantes, agentes inductores del flujo o agentes de fusión. Un comprimido puede prepararse por compresión o moldeado, opcionalmente con uno o más ingredientes adicionales. Los comprimidos prensados pueden prepararse comprimiendo el principio activo en una forma de flujo libre (por ejemplo, polvo, gránulos) opcionalmente mezclados con un aglutinante (por ejemplo, gelatina, hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, desintegrante (por ejemplo, glicolato de almidón de sodio, carboximetil celulosa reticulada) agente dispersante o activo de superficie. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como acacia, tragacanto o alginato de sodio, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, cera, o similares. Lubricantes usados en estas formas de dosificación incluyen oleato de sodio, estearato de sodio, estearato de magnesio, benzoato sódico, acetato sódico, cloruro sódico o similares. Los disgregantes incluyen, por ejemplo, almidón, metilcelulosa, agar, bentonita, goma xantana o similares. Los comprimidos moldeados se pueden fabricar mediante moldeo en una máquina adecuada de una mezcla del principio activo en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.

Los comprimidos o cápsulas pueden recubrirse o ranurarse y pueden formularse de forma que proporcionen una liberación lenta o controlada de la composición antioxidante. Las composiciones de liberación en tiempo para la liberación controlada de agentes contienen, en general, partículas de agente mezcladas con o recubiertas con un material que es resistente a la degradación entérica o desintegración durante un período seleccionado de tiempo. La liberación del agente puede producirse mediante sangrado, erosión, ruptura, difusión o acciones similares.

Los portadores pueden promover la estabilidad antioxidante así como proporcionar una liberación en tiempo. Una mezcla de carbohidratos vegetales denominados Fórmula AMBROTOSE® Phyto puede combinarse con la composición antioxidante. Tal combinación extiende la semivida de la composición antioxidante y proporciona una forma de liberación en tiempo. La fórmula AMBROTOSE® Phyto contiene, en una relación de peso/peso de aproximadamente 30/30/20/19/1, goma arábica (acacia), goma de xantano, goma de tragacanto, goma gati, (que se puede obtener TicGum) y un extracto de gel de aloe vera (por ejemplo, gel de hoja interior, Carrington Labs, Irving, TX, MANAPOL® polvos o producto similar). La Fórmula AMBROTOSE® Phyto se mezcla con la composición antioxidante de la presente invención en una relación de peso de 2:1 a 1:2. En otra realización, la Fórmula AMBROTOSE® Phyto se mezcla con la composición antioxidante en una relación de peso de 2:1.

Las cápsulas o comprimidos pueden contener componentes vegetales adicionales en porcentajes de peso inferiores al 0,1 al 90 % dependiendo de la formulación específica. En el caso de portadores, los portadores mismos no tendrán, en general, efecto sobre la significancia nutricional de la composición, sin embargo, estos portadores pueden tener significancia en el tiempo, emplazamiento y perfil de liberación de la liberación de las cantidades nutricionalmente efectivas de la presente invención. Por ejemplo, uno o más de los antioxidantes de la presente invención pueden liberarse en una o más émbolos para incrementar los niveles de antioxidantes tal como se detecta en, por ejemplo, sangre u orina, en una serie de sucesos de liberación. En otra realización, los antioxidantes pueden liberarse de algún modo regular o pueden incluso proporcionarse como un gradiente con adiciones en niveles de sangre u orina. De hecho, la presente invención puede incluir incluso la liberación de los antioxidantes lipófilos y lipófilos en distintos tiempos y o emplazamientos durante su digestión. Por ejemplo, se puede proporcionar un antioxidante en un portador efervescente para su liberación inmediata, mientras que se proporciona un antioxidante distinto para su liberación por, por ejemplo, ácido estomacal o en el tracto intestinal.

Procedimientos de formulación. Un procedimiento de formulación de una composición antioxidante compactada con rodillos comprende mezclar la AMBROTOSE® Phyto Formula con la composición antioxidante que se indica en el presente documento. La mezcla resultante se transfiere a un compactador de rodillos y se compacta entre rodillos para formar una compactación. La presión impartida en la mezcla potencia la adhesión física entre los ingredientes. La compactación se tritura posteriormente para formar una granulación. A continuación, se forma una granulación en la forma de dosificación deseada, tal como cápsulas o comprimidos. En un ejemplo, se puede usar un compactador con rodillos Fitzpatrick Chilsonator modelo 4LX10D con rodillos que se muescan por toda la cara y perpendiculares a

la rotación, que tienen una fuerza fija de 10 ton y una pantalla de Fitzmill de aproximadamente 0,093. El dispositivo de compactación con rodillos puede tener una velocidad de rotación variable, aplicación de fuerza y capacidades de anchura, por ejemplo, un sistema compactador de rodillos en seco de Gerteis Polygran (Gerteis, Alemania). El compactador de rodillos funciona aplicando uniformemente presión sobre una mezcla pasando la mezcla entre dos rodillos que giran inversamente. La presión impartida sobre la mezcla por los rodillos comprime la mezcla en una compactación, tal como una lámina o una cinta, que se tritura normalmente para producir gránulos. Como alternativa, la granulación se puede conseguir aplicando doble compresión, trituración o tamizado según se requiera. Se seleccionan los gránulos que tienen una malla n.º 20-80.

Se cree que una semivida más larga de la combinación compactada con rodillos de la composición antioxidante con Fórmula AMBROTOSE® Phyto se debe a la reducción en la cantidad de área de superficie de la composición antioxidante expuesta a oxígeno. La combinación compactada con rodillos también elimina la necesidad de cargas de excipientes en la cápsula o en el procedimiento de fabricación de comprimidos. Beneficios adicionales de una combinación de Fórmula AMBROTOSE® Phyto con la composición antioxidante que se indica en el presente documento incluyen: provisión de fibra no soluble que puede servir como disipador para electrones desparejados en el intestino y provisión de monosacáridos para la correcta estructura de glucoformas celulares responsables de la comunicación mediada por células en la reparación de células dañadas por radicales libres.

Dosificación. Las formulaciones de dosificación útiles para la administración de las composiciones de la presente invención incluyen cápsulas o comprimidos de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 mg de la composición antioxidante. En una realización, no se añaden cargas, portadores o estabilizadores a la composición. En otra realización, La Fórmula AMBROTOSE® Phyto se mezcla con la composición antioxidante de la presente invención en una relación de peso de 2:1, 1:1 o 1:2. En otra realización, la Fórmula AMBROTOSE® Phyto se mezcla con la composición antioxidante en una relación de peso de 2:1. En otra realización, una cápsula o comprimido proporciona 500 mg de composición antioxidante mezclada con AMBROTOSE® Phyto Formula. Para esta realización, se pueden tomar dos comprimidos o cápsulas al día. Los recubrimientos adecuados se pueden aplicar para aumentar la palatabilidad o retraso de la absorción.

La FIG. 8 y FIG. 9, muestran el área bajo la curva (AUC) neta para relaciones variantes de quercetina y tocoferoles mezclados mediante el uso del procedimiento de ORAC(o) para medir la capacidad antioxidante. La concentración total de la muestra (Q + MT) es de 10 µg/ml para cada porcentaje sometido a ensayo. Por ejemplo, a un 0 % de quercetina, la concentración de tocoferoles mezclados es de 10 µg/ml y no hay quercetina en la muestra. A un 10 % de quercetina, la muestra tiene 1 µg/ml de quercetina y 9 µg/ml de tocoferoles mezclados. A un 20 % de quercetina, la muestra tiene 2 µg/ml de quercetina y 8 µg/ml de tocoferoles mezclados. La sinergia se observa fácilmente entre el 40 y el 100 % de quercetina y se observa lo más fácilmente entre el 40 y el 90 % de quercetina. La línea recta representa el efecto aditivo, es decir, a un 10 % de quercetina, la línea representa la suma del 90 % de actividad de tocoferoles mezclados solo y el 10 % de actividad de quercetina sola. Se encuentra un efecto sinérgico por encima de esta línea.

Los principales ingredientes antioxidantes de la composición de la presente invención (flavonoides, tal como se representan por la quercetina, y una mezcla de al menos dos formas de vitamina E) comprende del 12,1 % al 100 %, del 30 % al 85 % o, en otra realización, aproximadamente el 82 % en peso de los cinco ingredientes. En una realización, la cantidad de quercetina es del 49,18 % y la cantidad de formas de vitamina E es del 32,79 % del peso total de los cinco ingredientes.

Los ingredientes secundarios (o potenciadores) de la composición de la presente invención (extracto de piel de uva, extracto de té verde y ciruela) comprenden del 0 % al 87,9 %, del 15 % al 70 % o aproximadamente el 18 % en peso de los cinco ingredientes. Como se muestra en la FIG. 10, la relación óptima de extracto de piel de uva y extracto de té verde se determinó en presencia del 49,18 % de quercetina, 32,79 % de tocoferoles y 1,64 % de ciruela. La relación óptima del extracto de piel de uva con respecto al extracto de té verde es de 60/40 a 80/20. En una realización, el extracto de piel de uva es del 9,84 % y el extracto de té verde es del 6,56 % del peso total de la composición de antioxidante. Se proporciona ciruela (*Terminalia ferdinandiana*) como un ingrediente de la composición en una cantidad de entre aproximadamente el 0 % al 87,9 % o, en otra realización de aproximadamente el 2 %. En la realización de la FIG. 10, la ciruela es el 1,64 % de la composición.

El ensayo ORAC(o) muestra que una mezcla antioxidante que tiene las siguientes relaciones en peso: quercetina, 49,18 %; tocoferoles mezclados, 32,79 %; extracto de piel de uva, 9,84 %; extracto de té verde, 6,56 %; y ciruela, 1,64 % tiene una actividad antioxidante de 17.254 micromoles de equivalentes de Trolox® por gramo.

Estabilidad de AMBROTOSE AO®. AMBROTOSE AO®, una mezcla de AMBROTOSE® (Mannatech, EE.UU.) y la formulación antioxidante de la presente invención a una relación en peso de 2:1, ha demostrado mantener su actividad bajo condiciones de estabilidad aceleradas (40 °C a un 75 % de humedad relativa) igualándose a una semivida de aproximadamente seis meses.

Validación del ensayo ORAC(o) en comparación con el ensayo ORAC(fl). La FIG. 11 es un gráfico de los resultados de ORAC(fl) que muestra que no tiene contribución en la actividad AO por el α-tocoferol cuando se mezcla en distintas relaciones con quercetina. El gráfico muestra un aumento lineal en la AUC que es directamente

proporcional al aumento en la concentración de quercetina en el ensayo ORAC(fl) en la solución estándar de acetona:agua. La falta de contribución en actividad AO puede deberse a que el  $\alpha$ -tocoferol no se diluye en acetona:agua.

5 Las FIG. 12A y 12B son gráficos de los resultados de ORAC(fl-lipo) usando tocoferol mezclado y los resultados del AUC relativa usando la solución de disolvente/agua/detergente para disolver la muestra y detectar la capacidad antioxidante tanto lipófila como lipófoba. En la FIG. 11 (arriba) se demostró que no se podría detectar una actividad estadísticamente significativa para el  $\alpha$ -tocoferol usando el procedimiento de ORAC(fl) estándar para detectar la contribución AO de AO lipófilos. Como se muestra en la FIG. 12A, el AUC de ORAC(fl-lipo) para  $\alpha$ -tocoferol se comparó entre el procedimiento de ORAC(fl-lipo) publicado (acetona:agua) y un acetona:agua:Tween-20 y se detectó un gran aumento en el AUC del ensayo de ORAC(fl-lipo). La FIG 12B demuestra que no se detecta sinergia mediante el uso del procedimiento de ORAC(fl-lipo) conocido cuando se combina quercetina y tocoferoles mezclados como los resultados siguen una línea recta a través del abscisa, que indica una falta de sinergia mediante el uso de este ensayo.

15 La obtención de estos resultados con ensayos conocidos no es sorprendente basándose en una investigación de la literatura y los procedimientos que se recomiendan en el presente documento. Los estándares actuales para la evaluación de los denominados "Alimentos altos en ORAC" (véase, por ejemplo, [www.ars.usda.gov](http://www.ars.usda.gov)) indica que el estándar es medir el potencial antioxidante del lipófilo aparte y separado de los antioxidantes lipófobos. La presente invención elimina la necesidad de esta dicotomía, una dicotomía que probablemente resulta en la desconexión que los investigadores han observado mientras que relacionan los valores de ORAC del tubo de ensayo con respecto al efecto sobre los valores de ORAC en suero. Cuando se miden los efectos antioxidantes en suero en comparación con una evaluación ORAC(fl), el Servicio de Investigación Agrícola de USDA halló que, por ejemplo, las espinacas tenían una puntuación inferior a las fresas en el ensayo ORAC de tubo de ensayo, pero las espinacas tenían un efecto superior en los valores de ORAC de suero que las fresas. Mediante el uso de la presente invención y las composiciones que se describen en el presente documento, los presentes inventores han remediado la desconexión mediante el desarrollo de un sistema que permite la interacción entre antioxidantes con distintas solubilidades, que refleja mejor la actividad de los antioxidantes dentro del organismo humano. Los procedimientos de ORAC(fl) y/u ORAC(fl-lipo) indirectos no miden la actividad antioxidante total y no detectan los efectos sinérgicos de determinados alimentos.

20 La FIG. 13 es un gráfico de los resultados del AUC de ORAC(fl) mediante el uso de  $\alpha$ -tocoferol con una variación en la cantidad de detergente usado para mostrar su efecto sobre las mediciones del AUC. En este ensayo, el un tercio de disolvente su usó en su totalidad de un tercio en una mezcla con una cantidad inferior de Tween-20. La FIG. 14 es un gráfico de un ensayo ORAC(fl) que mide la actividad antioxidante medida para una relación fija de quercetina: $\alpha$ -tocoferol relación disuelta en dos relaciones distintas de disolvente:agua con respecto a mezclas de detergentes. Los resultados en la FIG. 13 y la FIG. 14, muestran que el detergente (Tween-20) tuvo que ver con el aumento en el AUC y, de este modo, muestra que la detección de la actividad de ORAC(fl) se aumenta en comparación con la mezcla de acetona:agua estándar.

### Ejemplo 3. Detección ORAC(o) de sinergia y potenciación antioxidante.

30 Para demostrar que el ensayo ORAC(o) era capaz de detectar tanto la actividad lipófila como lipófoba, se llevaron a cabo una serie de estudios para demostrar el efecto de las combinaciones específicas de concentraciones conocidas de antioxidante lipófilo y lipófobo y la potenciación del mismo con la adición de, por ejemplo, extracto de semilla de uva y extracto de té verde en comparación con extracto de semilla de uva y extracto de té verde solos. La FIG. 15 es un gráfico que muestra los valores de ORAC(o) obtenidos con distintas relaciones de quercetina y tocoferoles mezclados. La FIG. 16 es un gráfico que muestra los valores de ORAC(o) para una relación distinta de extracto de semilla de uva (GES) y extracto de té verde (GTE). Después de la determinación de la relación máxima para la actividad antioxidante de GSE y GTE, las dos se determinaron con la relación optimizada para la quercetina y tocoferoles mezclados. La FIG. 17 es un gráfico que muestra los valores de ORAC(o) de la combinación del máximo de las relaciones de quercetina:tocoferol mezclado y el extracto de semilla de uva y extracto de té verde. Se halló que la quercetina combinada y los tocoferoles mezclados, GSE, GTE maximizaron el potencial antioxidante del complemento.

45 **Ejemplo 4:** Efecto antioxidante de AMBROTOSE AO® en un pequeño número de individuos sanos, estudio de "etiqueta abierta", controlado sin placebo.

50 Un antioxidante se define como cualquier sustancia que puede retrasar o prevenir la oxidación de sustancias biológicas. Las dietas ricas en frutas y verduras que contienen antioxidantes se han asociado con una incidencia reducida de afecciones patológicas que se piensa que son resultado del estrés oxidativo. Sin embargo, la complementación con compuestos antioxidantes aislados ha demostrado a menudo ser ineficaz en la mejora de la salud, en algunos casos, y peligroso en otros<sup>1,3,4</sup> Se ha sugerido que los beneficios antioxidantes de una elevada ingesta de frutas y verduras puede no resultar exclusivamente de antioxidantes individuales sino más bien de una acción concertada de una combinación de distintos antioxidantes presentes en estos alimentos<sup>5,6</sup> Este foto sobre antioxidantes individuales es una posible explicación de por qué los científicos tienen aún que duplicar los efectos protectores de una dieta rica en antioxidantes mediante el uso de complementación nutricional.<sup>7</sup>

60

Estudios recientes han sugerido que los complementos gluconutricionales (GN), complementos nutricionales que proporcionan azúcares que soportan la comunicación celular y función inmunitaria, tienen propiedades antioxidantes tanto *in vitro* como *in vivo*. Células de hígado de rata cultivadas en medio que contiene complementos GN mostraron niveles superiores de glutatión reducido en comparación con los controles, demostrando, de este modo, una protección antioxidante aumentada.<sup>8</sup>

Un estudio piloto clínico demostró una reducción en biomarcadores de estrés oxidativo y un aumento en biomarcadores de defensa oxidativa en gente que consumía complementos GN. Se observaron aumentos significantes en la capacidad de unión a hierro total y ácido fólico y se observó una disminución significativa en la relación de cobre/ceruloplasmina a los 76 días después de la adición diaria de 2 g de complemento GN a la dieta normal. También se observaron tendencias que sugirieron una disminución en los alquenes de suero, homocisteína, 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG) y colesterol total y un aumento en capacidad de absorbanza de radicales de oxígeno (ORAC<sub>β-PE</sub>).<sup>9</sup>

Estudios recientes han demostrado que una amplia gama de nutrientes (algunos conocidos, otros aún no identificados) representan la actividad antioxidante de frutas y verduras.<sup>10,11,12,13,14</sup> Algunos de los antioxidantes beneficiosos conocidos incluyen polifenoles y vitaminas C y E.<sup>6</sup> Determinados alimentos y bebidas, incluidas uvas (y vino tinto), té verde y la ciruela australiana (*Terminalia ferdinandiana*), contienen niveles relativamente elevados de tales antioxidantes.<sup>6,15,16</sup> Este estudio midió la protección antioxidante proporcionada por un complemento nutricional novedosa que combinaba complemento GN con una mezcla procedente de té verde, uvas, tocoferoles mezclados, quercetina y la ciruela australiana.

Procedimientos: Se recogieron muestras de sangre mediante Cover-Tek, Inc., Dallas, TX. Se analizaron todas las muestras de sangre y orina por Genox Corporation, Baltimore, MD y todos los análisis estadísticos se realizaron mediante Decision Analyst, Arlington, TX.

Se ha publicado un número de procedimientos para evaluar el potencial antioxidante de las muestras<sup>17</sup> El ensayo usado en este estudio fue la medición del suero completo de ORAC<sub>β-PE</sub>. Este procedimiento usa β-ficoeritrina, una sonda fluorescente, para determinar la capacidad de eliminación antioxidante de las muestras de suero, específicamente frente a radicales de peróxido, cuando se comparó con un estándar conocido, Trolox®. Los resultados se expresan en micromoles de Equivalentes de Trolox (ET) por gramo.<sup>18</sup> Otras técnicas analíticas estandarizadas usadas en el estudio fueron la medición de hidroperóxidos lipídicos en orina y alquenes, que se relacionan indirectamente con la cantidad de daño de radicales libres con respecto a lípidos y orina 8-OHdG, que se relacionan indirectamente con el daño de ADN.<sup>19, 20, 21</sup>

El complemento nutricional antioxidante usado en este estudio, Ambrotose AO®, se desarrolló usando una evaluación *in vitro* de los ingredientes: quercetina, tocoferoles mezclados, extracto uva, extracto de té verde, la ciruela australiana. Los valores antioxidantes *in vitro* de cada ingrediente se determinaron usando el procedimiento ORAC<sub>fl</sub> estándar (que usa una sonda fluorescente distinta, fluoresceína). Los valores antioxidantes de las mezclas de ingredientes se determinaron usando un procedimiento desarrollado nuevo que mide el oxígeno disuelto directamente, el ORAC<sub>o</sub>. Puesto que los antioxidantes solubles en agua y lípidos trabajan conjuntamente *in vivo*, el ORAC<sub>o</sub>, que mide simultáneamente las contribuciones e interacciones de los compuestos solubles en agua y lípidos, es una mejora sobre los procedimientos a base de fluorescencia (ORAC<sub>fl</sub>, ORAC<sub>fl-lipo</sub> y ORAC<sub>β-PE</sub>). Estos procedimientos, como mejor, miden las actividades de los compuestos solubles en agua lípidos y agua solos. Por lo tanto, el ORAC<sub>o</sub> proporciona una determinación más precisa de la actividad antioxidante *in vitro* total de una mezcla de tanto ingredientes solubles en agua como en lípidos. Los ingredientes solubles en agua y en lípidos se combinaron y evaluaron con el ORAC<sub>o</sub> para establecer una sinergia máxima y el valor ORAC<sub>o</sub> *in vitro* óptimo de la mezcla.

La mezcla posterior se compactó con rodillos con complejo Ambrotose® a una relación de 1:2 para crear Ambrotose AO®. Muchas de las gomas naturales en Ambrotose® se han usado para controlar la liberación de compuestos que proporcionan un suministro sostenido. Este estudio se diseñó para determinar la actividad antioxidante *in vivo*, usando ensayos estandarizados, de distintas cantidades de Ambrotose AO® como se ha determinado directamente mediante ORAC<sub>β-PE</sub> de suero e indirectamente mediante hidroperóxido lipídico en orina, alquenal y análisis de 8-OHdG. Antes y Cao han sugerido recientemente que una batería d ensayos, en lugar de cualquier ensayo individual, es necesario puesto que algunas afecciones patológicas, tales como disfunción renal, pueden alterar cualquier ensayo bastante no relacionado con el estrés oxidativo.<sup>22</sup>

Se obtuvo consentimiento informado de todos los participantes. Se registraron doce pacientes voluntarios sanos machos y hembras que no tomaban complementos nutricionales o cualquier fármaco que pudiera interferir con el estudio. Los sujetos de estudio, cuatro hombres y ocho mujeres de 22-61 años, consumieron cantidades en aumento del complemento antioxidante. Para evaluar la variabilidad de ORAC<sub>β-PE</sub> con el tiempo y para evaluar la reproducibilidad de los resultados de laboratorio, y se recogieron muestras de sangre y orina de un sujeto adicional que no estaba tomando complementos. Durante el estudio, los participantes continuaron sus vidas habituales y dietas antes del estudio.



La Tabla 5 proporciona información sobre los sujetos de estudio.

Sujeto	Sexo	Edad	Consumidor de tabaco
1	F	33	Sí
2	M	41	No
3	F	34	No
4	F	61	Sí
5	F	44	Sí
6	M	22	No
7	F	36	No
8	M	23	No
9	F	38	Sí
10	F	56	No
11	F	53	No
12	M	31	Sí

A los doce sujetos de estudio se les sometió a análisis de orina y de  $ORAC_{\beta-PE}$  de suero en ayunas después de un período inicial de lavado de 2 semanas en el que no tenían complementos y al final de las 2 semanas en cada cantidad en aumento del complemento antioxidante. Las cantidades usadas fueron de 500 mg (1 cápsula) al día durante los primeros 14 días de uso del complemento (Período 1), 1,0 g (2 cápsulas) cada día para el segundo período de 14 días (Período 2) y 1,5 g (3 cápsulas) cada día durante el tercer período de 14 días (Período 3). Adicionalmente, se analizó una muestra por triplicado de sangre y orina del individuo que no consumía complementos para evaluar la precisión de los análisis. Se recogieron muestras de sangre y orina mediante el flebotomista independiente, se envasó inmediatamente en hielo seco y se transportó a un laboratorio de hospital para su preparación. Las muestras de suero y orina preparadas se enviaron, a continuación, en hielo seco durante la noche a Genox para un análisis independiente para el protocolo de Genox.<sup>23</sup> Todas las muestras se almacenaron en Genox en hielo seco y se realizaron las mediciones de  $ORAC_{\beta-PE}$  y orina al mismo tiempo a la finalización del estudio para minimizar cualquier variabilidad de reactivo analítica.

Resultados: Valores de ORAC y datos de cambio de porcentaje a partir del valor basal. Los valores de  $ORAC_{\beta-PE}$  y el cambio de porcentaje a partir del nivel basal de doce participantes que tomaban Ambrotose AO® se proporcionan en la Tabla 6. El valor basal es después de un lavado de 2 semanas, Período 1 después de 2 semanas con 500 mg, Período 2 después de 2 semanas con 1,0 g y Período 3 después de 2 semanas con 1,5 g. Las etiquetas de vial de suero de algunas muestras del Período 2 se despegaron debido a su envío a Genox. Los valores de  $ORAC_{\beta-PE}$  solo se pudieron asignar específicamente a tres de los participantes del estudio durante este período y no para el resto de los participantes del estudio o el individual no estudiado adicional.

**Tabla 6. Valores de  $ORAC_{\beta-PE}$  y cambio de porcentaje a partir del valor basal**

Sujeto	ORAC			% de cambio a partir del valor basal			
	Valor basal	Período 1	Período 2*	Período 3	Período 1	Período 2	Período 3
1	3300,3	5709,4		3117,8	73,0 %		-5,5 %
2	3754,5	4618,6	6731,8	6189,0	23,0 %	79,3 %	64,8 %
3	3695,0	3867,9		3995,7	4,7 %		8,1 %
4	3954,3	3199,1		2703,8	-19,1 %		-31,6 %
5	3107,3	3295,2		4476,2	6,0 %		44,1 %
6	3313,0	5073,8		3156,6	53,1 %		-4,7 %
7	3785,5	5069,9		4390,4	33,9 %		16,0 %
8	3341,2	4207,7		4003,2	25,9 %		19,8 %
9	7568,9	6053,2	8977,6	7734,1	-20,0 %	18,6 %	2,2 %
10	4271,8	6132,5		6765,0	43,6 %		58,4 %
11	5619,2	6527,0	6420,0	6844,3	16,2 %	14,3 %	21,8 %
12	5642,9	5025,4		4398,7	-10,9 %		-22,0 %

Análisis Estadístico de datos de ORAC sin procesar. Se llevó a cabo un ANOVA con medidas repetidas para determinar si hubo alguna diferencia entre el valor basal, Período 1, Período 2 y Período 3 de los datos ORAC sin procesar. Hubo diferencias significativas entre los periodos de tiempo en su totalidad  $F(3,24) = 4,02$ ,  $p = .020$ ). Los análisis *post hoc* revelaron que el Período 2 fue significativamente distinto del valor basal ( $t(24) = -3,47$ ,  $p = .002$ ). El

Período 1 fue significativamente distinto del Período 2 ( $t(24) = -2,77, p = .011$ ). El Período 2 fue significativamente distinto del Período 3 ( $t(24) = 2,87, p = .009$ ). La mediana para cada período de tiempo se muestra en la tabla 7.

Período de tiempo	Número de sujetos	Puntuación ORAC de mediana
<b>Valor basal</b>	12	4279,5
<b>Período 1</b>	12	4898,3
<b>Período 2</b>	3	7376,5
<b>Período 3</b>	12	4814,6

5 Análisis Estadístico de cambio de porcentaje de datos de ORAC del valor basal. En contraste con los datos sin procesar en el análisis dado a conocer anteriormente (Tabla 6) este análisis examinó las diferencias entre los períodos de tiempo expresados como cambio de porcentaje desde el valor basal. Se llevó a cabo un ANOVA de mediciones repetidas para evaluar las diferencias entre el cambio de porcentaje desde el valor basal del Período 1, Período 2 y Período 3 de los datos ORAC. El ensayo general no proporcionó una significancia en su conjunto ( $F(2,13) = 0,71, p = 0,510$ ). Adicionalmente, los análisis *post hoc* no revelaron diferencias significativas entre los períodos. La mediana para cada período de tiempo se muestra en la tabla 8.

Período de tiempo	Número de sujetos	Cambio de porcentaje de mediana	Puntuación $\pm$ de ORAC
Período 1	12	19,1 %	18,1 %
Período 2	3	37,4 %	90,3 %
Período 3	12	14,3 %	19,0 %

10 El hidropéroxido lipídico promedio, el alquenal y los valores de 8-OHdG se resumen en la Tabla 9. Se corrigen para la variabilidad de la concentración de orina dividiendo por orina creatinina como se ha medido al mismo tiempo sobre la misma muestra.

Período de tiempo	Número de sujetos	Hidropéroxido/creatinina $\mu\text{M}/(\text{mg}/\text{dl})$	Alquenal/creatinina $\mu\text{M}/(\text{mg}/\text{dl})$	8-OHdG/creatinina $(\text{mg}/\text{ml})/(\text{mg}/\text{dl})$
Valor basal	12	0,0920	0,0761	0,0724
Período 1	12	0,0808	0,0808	0,0861
Período 2	12	0,0782	0,0835	0,0740
Período 3	12	0,0764	0,0806	0,1025

15 Calidad del aire. Se conoce que la calidad del aire afecta los niveles de estrés oxidativo. Concentraciones en aumento de contaminantes comunes, tales como dióxido de ozono y nitrógeno, disminuyen la calidad del aire. Esto lleva a un potencial superior para la generación de ROS.<sup>24,25</sup> Se proporciona un resumen de los índices de calidad del aire promedio de la Agencia de Protección Medioambiental (EPA) de los EE.UU. para cada período de dos semanas en la región de Dallas/Fort Worth (DFW), donde vivían los sujetos, en la Tabla 6. La EPA usa códigos de colores para sus mapas de calidad de aire de área: Verde: "Bueno" (0 - 79 partes por mil millones [ppb] de ozono), Amarillo: "Moderado" (80 - 99 ppb), Naranja: "Malsano para grupos sensibles" (100 - 124 ppb), Rojo: "Malsano" (125 - 149 ppb) y Morado: "Muy malsano" (superior a 150 ppb). Un valor numérico para cada mapa de EPA diario del área de estudio se calculó asignando números a los colores: Verde: 1, Amarillo: 2, Naranja: 3, Rojo: 4 y Morado: 5 y mediante la estimación del promedio numérico para cada día basándose en el área de cada color en los mapas de EPA publicados. Los valores numéricos diarios se ponderaron, a continuación, para cada período de dos semanas del estudio (Tabla 10).

Período de tiempo	Índice de calidad del aire de EPA promedio
Valor basal	1,0 (intervalo 1,0-1,0)
Período 1	1,0 (intervalo 1,0-1,1)
Período 2	1,4 (intervalo 1,0-2,5)
Período 3	1,8 (intervalo 1,0-2,5)

25 Teniendo en cuenta cierto grado de incertidumbre en la asignación de valores a los participantes del estudio en el Período 2 como se ha señalado anteriormente, se calculó el promedio más bajo posible de ORAC $_{\beta-PE}$  para los 12 participantes del estudio. Asumiendo que los 9 valores más bajos de las muestras de suero cuyas etiquetas no se

5 pudieron identificar pertenecían a los participantes y combinándolas con 3 valores conocidas proporciona el promedio más bajo posible y, de este modo, la estimación más conservativa del cambio desde el valor basal. Los 9 valores ORAC<sub>β-PE</sub> más bajos fueron, 4727,9, 5233,9, 5104,3, 4599,9, 5699,9, 5364,8, 3987,3, 4179,7 y 4584,9. Cuando se combinaron con los 3 valores del Período 2 a partir de la Tabla 5, esto proporcionó un valor de ORAC<sub>β-PE</sub> promedio de 5467,70 para los 12 participantes del estudio en el Período 2. Este es el 27,8 % por encima del valor basal promedio de 4279,49.

10 Discusión. Los estudios han mostrado que el consumo de dietas ricas en frutas y verduras resulta protector frente al estrés oxidativo.<sup>7,26,27</sup> Directrices dietéticas defienden el consumo de 2-4 raciones de fruta y 3-5 raciones de verduras.<sup>28</sup> A pesar de este conocimiento y estas recomendaciones, muy pocos individuos en los EE.UU. consumen las cantidades diarias recomendadas. En un estudio clínico patrocinado por el Departamento de Agricultura de los EE.UU. (USDA), los investigadores hallaron que un consumo aumentado de frutas y verduras, en especial, de las normales cinco a las diez raciones experimentales al día, aumentaron significativamente los valores de ORAC<sub>β-PE</sub> significativamente hasta aproximadamente un 13 % después de dos semanas.<sup>7</sup> En el estudio actual, el aumento en los valores de ORAC<sub>β-PE</sub> suero promedio mediante el uso de cada cantidad de complemento fueron: 19,1 % con 500 mg, 37,4 % con 1,0 g y 14,3 % con 1,5 g. Estos datos sugieren que la cantidad óptima que da como resultado el mejor aumento en ORAC<sub>β-PE</sub> en suero sobre el valor basal en personas sanas es de 1,0 g. La estimación conservativa de un 27,8 % de aumento de porcentaje con 1,0 g de Ambrotose AO® es más del doble que el 13 % de individuos informados publicado que consumen cinco frutas y verduras adicionales al día.

20 Los valores de hidroperóxido lipídico de orina/creatinina disminuyeron con un aumento de uso del complemento. La disminución para cada cantidad fue de 12,1 % con 500 mg, 15,0 % con 1,0 g y 17,0 % con 1,5 g, sugiriendo que la protección del daño lipídico aumentó con cantidades en aumento de complemento sobre el intervalo estudiado. No resulta claro por qué los datos de hidroperóxido lipídico no se correlacionan exactamente con los valores de ORAC<sub>β-PE</sub>. El ORAC<sub>β-PE</sub> de suero es una medida de la protección antioxidante de la sangre con respecto a su capacidad para desactivar radicales libres en el momento de la medición. Los hidroperóxidos lipídicos de orina son un marcador del daño oxidativo lipídico en algún momento en el pasado. La relación temporal entre el daño lipídico real y el aspecto de los hidroperóxidos lipídicos en la orina no queda bien definida. Puede ser que estas diferencias temporales justifiquen, en parte, esta varianza. Además de los hidroperóxidos lipídicos de orina, también se midió 8-OHdG de orina y alquenes en cada período de tiempo. No se observaron diferencias ni tendencias significativas. Esto de nuevo puede estar relacionado con la relación temporal entre el daño lipídico y de ADN real y el aspecto de los biomarcadores en la orina.

30 Los participantes en el estudio vivían en el área de DFW. Las evaluaciones de la calidad de aire diaria de EPA publicadas para DFW se ponderaron para cada periodo de 2 semanas. La calidad del aire fue empeorando durante el transcurso del estudio. Esto se esperaría que aumente normalmente el estrés oxidativo aumentando el ROS y, de este modo, aumentando los biomarcadores de daño oxidativo, tal como los hidroperóxidos lipídicos.<sup>29</sup> Por el contrario, la protección aumentada fue evidente según se midió mediante valores ORAC de suero aumentados. Además, una tendencia a la baja en los valores de hidroperóxido lipídico en orina y la estabilidad de 8-OHdG de orina y alquenes proporciona pruebas de daño oxidativo reducido. En conjunto, estos datos sugieren que los efectos antioxidantes otorgados por el complemento podrían haber sido superiores que los efectos que se midieron realmente.

40 Conclusiones. Mientras que se recomienda que los individuos consumas frutas y verduras de acuerdo con las directrices publicadas, la realidad es que la gran mayoría no lo hace. Estos datos preliminares sugieren que un complemento nutricional que contiene ingredientes antioxidantes óptimos que conservan la actividad antioxidante en el producto final aumenta la protección antioxidante en individuos sanos según se ha medido mediante ORAC<sub>β-PE</sub> de suero y disminuye el daño oxidativo lipídico según se ha medido por los hidroperóxidos lipídicos de orina. La protección en gente sana según se ha demostrado por el aumento en ORAC<sub>β-PE</sub> de suero según un valor basal después de dos semanas fue superior usando 500 mg, 1,0 g y 1,5 g de Ambrotose AO® que el documentado en los datos publicados con la adición de cinco frutas y verduras a la dieta durante dos semanas (19,1 %, 37,4 % y 14,3 % frente a 13 %).

50 Como se muestra en el presente documento, se examinaron complementos antioxidantes usando cuatro medidas de estrés oxidativo en gente sana y se halló un aumento en ORAC<sub>β-PE</sub> de suero. Mientras que el intervalo óptimo entre sujetos sanos como se sugirió mediante los valores de ORAC<sub>β-PE</sub> fue de 1 g al día, la investigación ha demostrado que los individuos con valores ORAC de suero bajo pueden beneficiarse de la complementación de antioxidantes de alta dosis.<sup>30</sup> De este modo, aquellos que padecen un estrés oxidativo aumentado o, de otro modo, individuos estresados pueden beneficiarse de dosis más grandes.

55 Mientras que el ORAC<sub>o</sub> se usó en la formulación de mezcla antioxidante, un laboratorio independiente usó un procedimiento establecido, el ORAC<sub>β-PE</sub>, para analizar muestras de plasma en ensayo clínico de ser humano. La evaluación in vivo de la eficacia antioxidante del producto Ambrotose AO® no se basó en el uso del procedimiento ORAC<sub>o</sub>. Estos datos demuestran que el presente complemento antioxidante aumenta la protección antioxidante en consumidores según se ha medido mediante ORAC(β-PE) de suero y disminuye el daño oxidativo lipídico según se ha medido mediante hidroperóxidos lipídicos de orina.

Ejemplo 5. Se implementa material de polisacáridos como agente de liberación en tiempo para moléculas de bioactivos cuando la compactación con rodillos con o por encima de 10.000 psi. Los presentes inventores reconocieron que determinadas formulaciones y procedimiento desarrollados para estudiar la desintegración de sus formulaciones que usan, por ejemplo, Ambrotose AO®, no liberaron como se esperaba, es decir, liberación inmediata de los componentes, por ejemplo, la quercetina antioxidante. El estudio empezó con el uso de técnicas analíticas formales bien conocidas, usadas para procesar todos los ejemplos que se muestran aquí. El procedimiento contiene dos niveles de detalle puesto que se diseñó inicialmente para que fuera completamente cualitativo y medir la quercetina antioxidante como el analito. Inicialmente, las interpretaciones visuales de los componentes distintos a la quercetina indicaron un perfil de liberación inesperado, es decir, las condiciones de disolución en las que se realizaron las comparaciones fueron idénticas pero los resultados reales no lo fueron.

La Figura 18 muestra los tres módulos seleccionados para la investigación inicial. Se sometieron a ensayo cuatro muestras por separado en tres etapas para: quercetina, piel de uva y otros dos productos (Fórmula A antioxidante y Fórmula B antioxidante). Cabe destacar que la etapa de "Disolución controlada" fue la misma para todos los ejemplos. En resumen, los procedimientos a base de disolución para la subsanación de liberación modificada con Ambrotose AO® incluía HPLC y UV-Vis que usa quercetina como el marcador. Además, las observaciones visuales de las formulaciones fueron consistentes con las observaciones de HPLC y UV/Vis.

Las especificaciones actuales para la calificación de liberación de complemento dietético en muchos países incluyen disposiciones para la completa desintegración de las forma de producto en comprimido o cápsula en un aparato que simula aproximadamente las condiciones físicas del intestino. Estas condiciones aplican tanto para las especificaciones basadas en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) como en la Farmacopea Británica (BP). El ensayo de desintegración se describe mejor como la simulación de la disponibilidad física del material de complemento de su interacción con el sistema digestivo. Las condiciones en las que el componente se introduce en el cuerpo influencia la velocidad y eficiencia de su disponibilidad. La velocidad y eficiencia de la disponibilidad de nutrientes puede describirse como una "curva de disponibilidad". Una curva estrecha e intensa podría ser representativo de una inyección intravenosa, por ejemplo, mientras que los nutrientes de enlace fibrosos tales como los que se encuentran en los alimentos que se tienen que digerir antes de que estén disponibles tendrían una curva más amplia debido a una liberación más gradual. Dependiendo del comportamiento deseado, un modelo de distribución puede desarrollarse usando medios portadores tanto de rápida actuación como de liberación en tiempo.

Los perfiles de disolución de agentes activos en una formulación líquida de liberación sostenida de la presente invención se sometieron a ensayo usando, por ejemplo, ensayos de perfil de pH bajo estándar o de disolución en agua. En resumen, el Ambrotose® compactado con rodillos se sometió a ensayo para su liberación en porcentaje mediante disolución en un baño de agua a 37 grados Celsius en un litro de agua desionizada en el que se disolvieron 5,0 gramos de cloruro de potasio con paletas que mezclan la muestra a 150 revoluciones por minuto (RPM). Se añade una muestra de ensayo de 5 mililitros a la formulación líquida, neta o titulada, al baño usando una jeringa (que puede lavarse en la mezcla de agua/KCl). Los alícuotas de 2 ml pueden muestrearse a, por ejemplo, 0,5, 1,3 y 8 horas. Como alternativa, el perfil de disolución podría someterse a ensayo disolviendo las formas de dosificación usando un baño de disolución de Distek modelo 2100B configurado como Aparato USF II (paletas). La rotación de paletas se estableció a 50 rpm. El medio de disolución puede ser, por ejemplo, 900 ml de pH 6,8 de tampón de fosfato a 37 °C.

Desafortunadamente, en enfoque aceptado actual al ensayo de desintegración, que sigue las especificaciones guiadas por la USP y BP de la desintegración visual total a los treinta minutos, es deficiente en la evaluación precisa de la disponibilidad de complementos con más curvas graduales que les lleva más tiempo volverse accesibles para el intestino. La cápsula Ambrotose AO® se diseñó específicamente para la liberación sostenida y disponibilidad gradual y no se desintegra completamente en la ventana de treinta minutos. Esto no se debe observar como un fracaso de Ambrotose AO® de estar disponible en el tiempo de ejecución asignado, en lugar de un sesgo en el procedimiento actual hacia componentes de rápida actuación. Los requisitos de desintegración de USP y BP fuerzan indirectamente una disponibilidad relativamente estrecha. En algunas aplicaciones, esto resulta indeseado o potencialmente tóxico dependiendo del componente implicado. Se proporciona un procedimiento simple de disolución, tecnologías UV-Vis y HPLC para mostrar las actividades de liberación prolongada deseadas de Ambrotose AO®. La meta principal es calificar UV-Vis solo como suficiente en la medición de esta actividad, con el procedimiento de HPLC más implicado simplemente usado para correlacionarse con el rendimiento de UV-Vis.

Procedimientos. Se escogió quercetina como el analito en este procedimiento debido a su elevada actividad UV-Vis a 377 nm, porcentaje de composición relativamente elevado en Ambrotose AO® y cromatografía con buen funcionamiento. Un material estándar de la misma reserva de quercetina usada en la formulación de Ambrotose AO® se usó para proporcionar una curva de referencia dentro del intervalo de concentración esperado a partir del ensayo de disolución. Debe señalarse que un lote australiano de Ambrotose AO® de Mannatech se usó en este estudio como la carga inicial para justificar que el fallo de las formulaciones de los ensayos de desintegración administrados de TGA según el BP.

Las condiciones de disolución se modelaron después de tanto USP como BP para ensayos similares. Una excepción es que se escogió una velocidad de rotación superior en lugar de la promedia para el aparato de disolución para mantener el tiempo de análisis razonable mientras que aún se mantenían resultados sanos. Se utilizaron técnicas de

medición dual para correlacionar los resultados aunque en la práctica se puede escoger un único procedimiento y el procedimiento de UV-Vis más simple solo sería ideal. Se realizaron observaciones del ensayo de desintegración de 30 minutos fracasado sobre las mismas muestras de ensayo. A continuación, la curva de disponibilidad del Ambrotose AO® basado en un marcador de quercetina se ilustró sobre 0,5, 1, 2, 3, 4 y 8 horas en condiciones de disolución especificadas. Este procedimiento simple y consistente puede repetirse por cualquier laboratorio adecuadamente equipado y podría trasladarse a un entorno de seguridad de calidad para el ensayo de liberación si fuera necesario.

Equipamiento. Sistema de disolución: Se utilizó un sistema de disolución de Hanson sistema SR8-Plus para este procedimiento. Se realizó usando el aparato USP configuración tipo II (paletas) con las profundidades de paleta calibradas según las especificaciones proporcionadas. El medio de disolución, basado en ensayos similares, fue de 800 ml de agua desionizada (d.i.) (18+ Mohm) por cesta, una temperatura de baño de 37 °C y una velocidad de paletas de 200 rpm. Para el muestreo se necesita una pipeta de 1 ml junto con tubos de ensayo de vidrio de 12 x 75 mm (o equivalentes) y metanol para diluciones en la preparación del análisis en los instrumentos. La dilución de las muestras, que se especifica en el procedimiento, coloca la concentración de quercetina máxima en el baño de ensayo dentro de un intervalo óptimo para el análisis tanto en el UV-Vis como HPLC.

Espectrofotómetro UV-Vis: Un espectrofotómetro UV-Vis (Cary 50 Bio, Varian), junto con una cubeta de vidrio de cuarzo se usaron para las mediciones. Se tomaron lecturas de longitud de onda únicas a 377 nm. Se usó la misma cubeta de cuarzo para todas las lecturas y el instrumento se redujo a cero usando las muestras T<sub>0</sub> iniciales a partir de cada baño de ensayo de disolución respectivamente. En la preparación de las lecturas UV-Vis, se evaluó el sistema para la capacidad de mantener un cero consistente así como lecturas en los 377 nm deseados.

Sistema HPLC. Se usó un sistema de HPLC de bomba binaria de LC-VP Shimadzu para las mediciones. El detector utilizado fue PDA SPD-M10A controlado a 377 nm con una velocidad de barrido de 6,25 Hz. La columna usada fue Phenomenex Hydro RP, 4,6 mm x 150 mm, con un tamaño de partícula de 5 µm. La columna y las celdas de flujo de PDA se mantuvieron a una temperatura de 30 °C. Se realizaron inyecciones de 20 µl para todas las muestras y estándares. Todas las muestras y estándares se pasaron a través de un filtro CA de 0,20 µm (Whatman) antes de su inyección en el HPLC. Se automatizaron las integraciones para la generación de picos consistentes. El paquete de software versión 7.2 de Shimadzu VP se usó para controlar el HPLC así como las integraciones. Le continuó el programa de gradiente usado en el análisis. El disolvente A fue 0,1 % de ácido fórmico en agua desionizada (d.i.) y el disolvente B fue 0,1 % de ácido fórmico en metanol. Todos los disolventes se desgasificaron antes del equilibrio del sistema y el tiempo de ejecución total para el análisis fue de 30 minutos. Se puede esperar que los picos de quercetina se eluyan aproximadamente a 14,8 minutos dadas estas condiciones.

Tabla 11. Programa de gradiente para sistema de HPLC de Quercetina

Minutos	% de concentración B
0,00	50
5,00	50
20,00	70
20,01	85
22,00	85
22,01	50
30,00	50

Estándares y muestras. Se creó un intervalo de estándares tanto para UV-Vis y HPLC usando diluciones en serie de quercetina de Pharmline HD (lote n.º 152560). Se proporcionaron estándares a un intervalo de concentración que se correlacionaba con una cápsula de Ambrotose AO® individual disuelta en un volumen de 800 ml de agua d.i. (~0-100 ppm). Todas las muestras se obtuvieron a partir de la misma botella de AUS de Ambrotose AO® (lote n.º N04081226) que se aceptó para su liberación que proporcionaba un lote de ensayo aceptable. Tanto los estándares como las muestras de ensayo se procesaron de un modo idéntico disolviéndose, en primer lugar, en agua d.i., sometiéndose a muestreo tal como se ha descrito en el procedimiento y diluyeron 1:3 con metanol antes de su análisis en los respectivos instrumentos.

Después de haber estabilizado las condiciones del sistema de disolución, se añadieron cápsulas de Ambrotose AO® una por baño. Se sugiere realizar un mínimo de tres baños para obtener una representación precisa de la actividad de disolución. El momento en el que se introducen las cápsulas en el baño se convierte en el tiempo T<sub>0</sub> y todas las lecturas para la curva de disponibilidad de quercetina se miden con respecto a esta lectura T<sub>0</sub> inicial. A continuación, se toman muestras a intervalos de media hora y a un volumen de 1 ml. Además, se reemplaza 1 ml de volumen de agua d.i. en el baño después del muestreo para mantener el volumen controlado. Se toma una muestra inicial de T<sub>0</sub> tan pronto se introducen las cápsulas en el baño. A continuación, las muestras continúan tomándose de 4-6 horas desde T<sub>0</sub> hasta que resulta aparente que la disolución de la muestra se ha completado. Una vez se han tomado todas las muestras se diluyen 1:3 con metanol y se agitan en sus tubos para leerlas para su análisis. Para el estándar de quercetina se realiza una solución de 100 pp en agua d.i. y se generan diluciones a partir de esa

reserva. Las disoluciones estándar se muestrean, a continuación, en volúmenes de 1 ml y se diluyen 1:3 con metanol y se agitan del mismo modo que las muestras para prepararlas para el análisis. Se toma un mínimo de cinco puntos de dilución en serie con el estándar sobre el intervalo anticipado de la concentración de quercetina.

5 El fotómetro se reduce a cero usando la cubeta de cuarzo (la misma que se usó para todas las lecturas) se cargó con T<sub>0</sub> a partir del baño de muestra que se está midiendo o 75 % de metanol en agua d.i. en el caso de mediciones de curva estándar. La cubeta de cuarzo se aclara con un volumen de agua d.i. para retirar cualquier quercetina residual entre las lecturas. El criterio de valoración se define como el punto en el tiempo en el que ya no se detecta un aumento en la actividad UV-Vis de la muestra después de dos lecturas consecutivas (una hora de tiempo). Este "nivel estable" marca el punto de disolución de quercetina completa de la cápsula. Si durante las lecturas de UV-Vis hay un valor inapropiado debido a una partícula que bloquea la trayectoria de fuente lumínica etc., se usa un ensayo Q para desechar la lectura y tomarla de nuevo. Resulta aparente que esto se produce como el resto de lectura, normalmente, en lugar de constante. Se toma un mínimo de tres lecturas por muestra para conseguir un promedio aceptable. Después de haber tomado las mediciones UV-Vis, las muestras se filtran y se someten individualmente en las condiciones de HPLC dadas para su comparación. Los datos de ambos instrumentos se correlacionan, a continuación, junto con la respuesta de la curva estándar para mostrar la respuesta gradualmente en aumento de las muestras de Ambrotose AO®.

Resultados. Aunque la instrumentación puede ser distinta, se incluye un resumen de los datos generados a partir de este estudio para su referencia. Esto ayuda a comprender el comportamiento esperado de la disolución de Ambrotose AO® según las condiciones experimentales dadas. A continuación hay una tabla y un gráfico, que resumen la correlación entre la respuesta de absorbancia UV-Bis y el área bajo la curva de HPLC escalada frente a tiempo para las diluciones estándar de quercetina. El intervalo que se muestra es de 0-200 % de actividad de quercetina esperada de Ambrotose AO®. Se proporcionan los promedios para las tres realizaciones por separado y las realizaciones que se muestran se realizaron en la misma fecha.

Tabla 12. Tabla de correlación de UV-Vis de HPLC de estándar

<b>Correlación UV/Vis - HPLC de quercetina de reserva AO como dihidrato de quercetina de Pharmline estándar HD (84 % de quercetina)</b>				
<b>% de conc. de quercetina</b>	<b>ppm</b>	<b>UV-Vis (abs)</b>	<b>HPLC (auc) 377</b>	<b>auc escalado para coincidir con abs</b>
<b>AO máx.</b>	<b>real</b>	<b>377 nm</b>	<b>nm</b>	<b>(auc / 1700000)</b>
<b>12,50 %</b>	3,13 ppm	0,0819	139412	0,0820
<b>25,00 %</b>	6,25 ppm	0,1628	284334	0,1673
<b>50,00 %</b>	12,50 ppm	0,3924	673170	0,3960
<b>100,00 %</b>	25,00 ppm	0,8283	1393657	0,8198
<b>200,00 %</b>	50,00 ppm	1,6170	2775937	1,6329

25 La correlación de valores del estándar se mostró alentadora basándose en las bajas variaciones observadas entre los dos instrumentos. Además, la respuesta de quercetina se encontró que fue lineal a través del intervalo completo de posibles concentraciones esperadas a partir de los ensayos de disolución de Ambrotose AO®. La Tabla 13 muestra una comparación similar dada la correlación de las curvas entre las de la absorbancia de UV-VIs y el área bajo la curva de HPLC escalada frente a tiempo para cada muestra. Como se puede ver una desviación similarmente baja se encuentra entre los dos instrumentos. Esto sugiere rigor en que el procedimiento de UV-Vis más simple puede realizarse de modo independiente como herramienta cuantitativa para medir el tiempo de liberación de quercetina total desde las cápsulas de Ambrotose AO®.

Tabla 13. Tabla de correlación de UV-Vis de HPLC de muestras

<b>Correlación de UV-Vis - HPLC de muestras de Ambrotose AO®</b>			
	<b>UV-Vis promedio (abs)</b>	<b>HPLC escalada (auc)</b>	<b>HPLC sin procesar (auc)</b>
<b>30 min</b>	0,0337	<b>0,0470</b>	79838
<b>60 min</b>	0,1820	<b>0,1592</b>	270556
<b>90 min</b>	0,2937	<b>0,2766</b>	470176
<b>120 min</b>	0,3623	<b>0,4012</b>	681963
<b>150 min</b>	0,4539	<b>0,4362</b>	741491
<b>180 min</b>	0,5269	<b>0,5284</b>	898248
<b>210 min</b>	0,5864	<b>0,5458</b>	927924

(continuación)

<b>Correlación de UV-Vis - HPLC de muestras de Ambrotose AO®</b>			
	<b>UV-Vis promedio (abs)</b>	<b>HPLC escalada (auc)</b>	<b>HPLC sin procesar (auc)</b>
<b>240 min</b>	0,6283	<b>0,6274</b>	<u>1066522</u>

La curva de las muestras muestra que el aumento gradual y consistente es la respuesta que se correlaciona con la disolución de quercetina. Esta respuesta puede observarse igualmente para ambos instrumentos sin ninguna desviación principal. Ensayos repetidos han demostrado que este aumento se extiende de promedio a 4 horas dadas las condiciones de disolución. Se pueden realizar repeticiones adicionales con distintos lotes de muestras para generar incluso más correlaciones. Los resultados que se muestran en las Tablas 12 y 13, se ilustran en los gráficos que se muestran en las Figuras 19 y 20, respectivamente. Los sedimentos se mantuvieron a 10.000 psi durante un mínimo de 120 segundos antes de volverse a triturar con un mortero y pilón y volverse a encapsular para el ensayo de disolución.

Discusión. Durante los estudios de disolución tal como se ha medido mediante absorbancia sobre la curva de tiempo, el Ambrotose AO® ha aumentado su actividad hasta 240 minutos más allá de la lectura inicial. Lo que se muestra es la desintegración gradual y consistente de la cápsula de Ambrotose AO® en la solución, mediante lo cual se puede interpretar como una disponibilidad gradual en el intestino. También cabe destacar que la desintegración visual sola a partir de la forma en comprimido o cápsula compacta no es el punto de finalización para la disolución total. Alguno de los materiales microencapsulados aún se pueden dispersar en la solución que une la quercetina que, a su vez, provoca que no esté aún fácilmente disponible.

Un análisis visual del estudio confirmó que en aproximadamente T<sub>60</sub> se separó una buena porción del material de cápsula de la cápsula en masa y, sin embargo, la curva de respuesta continúa aumentando. Este procedimiento puede usarse como una justificación de los procedimientos de USP y BO de desintegración fracasados mediante las cápsulas y un medio para medir la liberación modificada de complementos dietéticos. Específicamente, estos resultados se generaron en apoyo de las reivindicaciones de liberación modificada de Ambrotose AO®(Australia) y tiene el potencial de prolongarse a otra liberación modificada en comprimido o de cápsula de complemento dietético. El procedimiento también proporciona fiabilidad en una medición de UV-Vis simple para llevar a cabo resultados similares a los del HPLC más implicado. Las especificaciones de control de calidad pueden construirse alrededor de este hecho basándose en la respuesta de quercetina mínima con respecto al máx. medido en intervalos de tiempo especificados. La tasa de muestreo para estos tipos de resultados puede reducirse una vez ejemplos suficientes continúen apoyando los resultados.

Tabla 14. Ensayo de disolución de QUERCETINA

Tiempo	Quercetina AO*	Quercetina de sílice**	Comprimido de quercetina AO***
0 min	++++	-	-
60 min	++++	++++	+

\*Se mezcló quercetina pura 1:2 con Ambrotose AO®.  
 \*\*Quercetina pura mezclada 1:2 con gel de sílice y encapsulada (vegetal).  
 \*\*\*Mezcla de Ambrotose-quercetina comprimida a 10.000 psi, retriturada y encapsulada (vegetal).

Tabla 15. PIEL DE UVA

Tiempo	Semilla de uva AO*	Semilla de uva de sílice**	Comprimido de semilla de uva AO***
0 min	++++	-	-
60 min	++++	++++	-/+

\*Se mezcló extracto de piel de uva pura 1:2 con Ambrotose AO®.  
 \*\*Extracto de piel de uva pura mezclada 1:2 con gel de sílice y encapsulada (vegetal).  
 \*\*\*Mezcla de extracto de Ambrotose-piel de uva comprimida a 10.000 psi, retriturada y encapsulada (vegetal).

Tabla 16. Fórmula A antioxidante

Tiempo	AO y Fórmula A*	Fórmula A** de Sílice	Fórmula A AO Comprimido***
0 min	++++	-	-
60 min	++++	++++	++

\*Se mezcló Fórmula A pura 1:2 con Ambrotose AO®.  
 \*\*Fórmula A pura mezclada 1:2 con gel de sílice y encapsulada (vegetal).  
 \*\*\*Mezcla de Ambrotose-Fórmula A a continuación comprimida a 10.000 psi, retriturada y encapsulada (vegetal).

Tabla 17. Fórmula B antioxidante

Tiempo	AO y Fórmula B*	Fórmula B** de Sílice	Fórmula B AO Comprimido***
0 min	++++	-	-
60 min	++++	++++	++

\*Se mezcló Fórmula B pura 1:2 con Ambrotose AO®.  
 \*\*Fórmula B pura mezclada 1:2 con gel de sílice y encapsulada (vegetal).  
 \*\*\*Mezcla de Ambrotose-Fórmula B a continuación comprimida a 10.000 psi, retriturada y encapsulada (vegetal).

- Por lo tanto, usando condiciones idénticas: cápsula, pesos, etc., disolución de quercetina se sometieron a ensayo con el tiempo frente a una cápsula de Ambrotose AO® que se vació y recargó (para asegurar que la comparación de la cápsula fue la misma para todas las muestras), con una cápsula de la misma composición con la excepción de no estar compactada con rodillos. El Ambrotose AO® compactado con rodillos tenía un aumento de 4x - 8x en tiempo para alcanzar  $Q_{max}$  (la disolución de quercetina máxima). Ambrotose AO® en una forma suelta se liberó inmediatamente. Una comparación visual muestra la cápsula compactada con rodillos mantuvo su forma bien pasado el punto de descomposición de la versión no compactada con rodillos. Sin desear quedar ligado a teoría alguna, es posible que los polímeros de cadena larga del Ambrotose AO® puedan estar actuando como cadenas y la quercetina (o cualquier otra biomolécula activa para esta materia) "lixivie" una tasa controlada. Por tanto, los polisacáridos de cadena larga, por ejemplo, cadenas de 2 a aproximadamente 50.000 monómeros de sacáridos pueden comprimirse desde entre aproximadamente 100, 500, 1.000, 2.000 o incluso 10.000 psi con una o más cantidades nutricionalmente efectivas: antioxidantes, vitaminas, minerales, aminoácidos, ácidos nucleicos, sacáridos, mezclas y combinaciones de los mismos.
- Se comprenderá que las realizaciones particulares descritas en el presente documento se muestran a modo de ilustración y no como limitaciones de la invención. Las características principales de la presente invención se pueden emplear en diversas realizaciones sin alejarse del ámbito de la invención. Los expertos en la materia reconocerán, o serán capaces de determinar, sin usar más que la experimentación rutinaria, numerosos equivalentes de procedimientos específicos descritos en el presente documento. Tales equivalentes se consideran que están dentro del ámbito de la presente invención y están cubiertos por las reivindicaciones.

Todas las publicaciones y solicitudes de patentes mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de los expertos en la materia a la que pertenece la presente invención.

Todas las composiciones y/o procedimientos que se desvelan y reivindican en el presente documento se pueden realizar y ejecutar sin indebida experimentación a la luz de la presente divulgación.

## 25 **Referencias**

1. Koepke CM, Le L, McAnalley S, y col. Results of clinical trials with antioxidants: a review. GlycoScience & Nutrition (Official Publication of GlycoScience com: The Nutrition Science Site). 2003;4(3): 1-7.
2. Ochi HI Cheng RZ, Kantha SS, y col. The JAlCA-genox oxidative stress profile--an overview on the profiling technique in the oxidative stress assessment and management. Biofactors. 2000;13(1-4):195-203.
3. Vivekananthan DP, Penn MS, Sapp SKI y col. Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials. Lancet. 2003;361(9374):2017-2023.
4. Morris CD, Carson S. Routine vitamin supplementation to prevent cardiovascular disease: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. Ann Intern Med. 2003;139(1):56-70.
5. Boileau TW, Liao Z, Kim S, y col. Prostate carcinogenesis in N-methyl-N-nitrosourea (NMU)-testosterone-treated rats fed tomato powder, lycopene, or energy-restricted diets. JNatl Cancer Inst. 2003;95(21):1578-1586.
6. Ramberg J, Le L, Vennum E, y col. Why are natural source dietary supplements best? A review based on the vitamin C literature. GlycoScience & Nutrition (Official Publication of GlycoScience com: The Nutrition Science Site). 2003;4(4):1-8.
7. Cao GI Booth SL, Sadowski JA, y col. Increases in human plasma antioxidant capacity after consumption of controlled diets high in fruit and vegetables. Am J Clin Nutr. 1998;68(5):1081-1087.
8. Barhoumi R, Burghardt RG, Busbee DL, y col. Enhancement of glutathione levels and protection from chemically initiated glutathione depletion in rat liver cells by glyconutritionals. Proc Fisher Inst Med Res. 1997;1(1):12-16.
9. Goux WJ, Boyd S, Tone CM, y col. Effect of glyconutritionals on oxidative stress in human subjects: a pilot study. GlycoScience & Nutrition (Official Publication of GlycoScience com: The Nutrition Science Site). 2001;2(12): 1-10.



10. Leonard SS, Cutler D1 Ding MI, y col., Antioxidant properties of fruit and vegetable juices: more to the story than ascorbic acid. *Ann Clin Lab Sci.* 2002;32(2):193-200.
11. Rice-Evans CAI Miller NJ. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem Soc Trans.* 1996;24(3):790-795.
- 5 12. Gil MI, Ferreres F, Tomas-Barberan FA. Effect of postharvest storage and processing on the antioxidant constituents (flavonoids and vitamin C) of fresh-cut spinach. *J Agric Food Chem.* 1999;47(6):2213-2217.
13. Kurilich AC, Jeffery EH, Juvik JA, y col. Antioxidant capacity of different broccoli (*Brassica oleracea*) genotypes using the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay. *J Agric Food Chem.* 2002;50(18):5053-5057.
- 10 14. Wang SY, Zheng W, Galletta GJ. Cultural system affects fruit quality and antioxidant capacity in strawberries. *J Agric Food Chem.* 2002;50(22):6534-6542.
15. Brand JC, Cherikoff V, Lee A, y col. An outstanding food source of vitamin C. *Lancet.* 1982;2(8303):873.
16. Ramberg J. Green Tea. *GlycoScience & Nutrition (Official Publication of GlycoScience com: The Nutrition Science Site).* 2003;4(5):1-9.
- 15 17. McAnalley S, Koepke C, Lam L, y col. In vitro methods for testing antioxidant potential: a review. *GlycoScience & Nutrition (Official Publication of GlycoScience com: The Nutrition Science Site).* 2003;4(2): 1-9.
18. Cao GI Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants [ver comentarios]. *Free Radic Biol Med.* 1993;14(3):303-311.
- 20 19. Esterbauer HI Jurgens GI Quehenberger O, y col. Autooxidation of human low density lipoprotein: loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. *J Lipid Res.* 1987;28(5):495-509.
20. Ohishi N, Ohkawa HI Miike A, y col. A new assay method for lipid peroxides using a methylene blue derivative. *Biochem Int.* 1985;10(2):205-211.
21. Shigenaga MK, Ames BN. Assays for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: a biomarker of in vivo oxidative DNA damage. *Free Radic Biol Med.* 1991;10(3-4):211-216.
- 25 22. Prior RL, Cao G. In vivo total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med* 1999;27((11/12)):1173-1181.
23. Genox Corporation. Oxygen Radical Absorption Capacity Assay for measuring antioxidant activity. October 2001.
- 30 24. Rahman I, MacNee W. Role of oxidants/antioxidants in smoking-induced lung diseases. *Free Radic Biol Med* 1996;21(5):669-681.
25. Cross CE, van der Vliet A, O'Neill CAI y col. Reactive oxygen species and the lung. *Lancet.* 1994;344(8927):930-933.
26. Steinmetz KA, Potter JL). Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *Am. Diet Assoc.* 1996;96(10):1027-109.
- 35 27. Byers TI Guerrero N. Epidemiologic evidence for vitamin C and vitamin E in cancer prevention. *Am J Clin Nutr* 1995;62(6 Suppl):1385S-1392s.
28. Nutrition and Your Health: Dietary Guidelines for Americans. Home and Garden Bulletin No. 232, USDA and USDHHS: 1995.
- 40 29. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* 3ª edición. Nueva York: Oxford University Press, 2000.
30. Schmidt MC, Askew EW, Roberts DE, y col. Oxidative stress in humans training in a cold, moderate altitude environment and their response to a phytochemical antioxidant supplement. *Wilderness Environ Med.* 2002;13(2):94-105.

## REIVINDICACIONES

1. Un complemento dietético de liberación modificada que comprende:

una cantidad nutricionalmente efectiva de uno o más sacáridos que comprende uno o más polisacáridos de cadena larga y una cantidad nutricionalmente efectiva de uno o más complementos nutricionales seleccionados entre antioxidantes, vitaminas, minerales, aminoácidos, ácidos nucleicos, mezclas y combinaciones de los mismos,

en el que el complemento dietético está comprimido a una presión superior a 689,4 kPa, en el que los polisacáridos de cadena larga comprenden tanto un agente de liberación en tiempo para moléculas bioactivas como una porción del complemento dietético,

en el que el uno o más polisacáridos de cadena larga se aíslan de goma tragacanto, goma guar, harina de cereal, extracto de árbol de alerce, extracto de aloe vera, goma gati, almidón, goma arábiga, goma de xantano, sulfato de condroitina, polimannosa acetilada y mezclas o combinaciones de los mismos;

en el que uno o más antioxidantes de complementos nutricionales comprende un desactivador de radical de oxígeno lipófilo aislado y purificado y un desactivador de radical de oxígeno lipófilo aislado y purificado, en el que los desactivadores de radical de oxígeno lipófilo y lipófilo tienen un valor de desactivador de radical de oxígeno superior a 6.000 pMol de Equivalentes Trolox (ET)/gramo, y

en el que los polisacáridos de cadena larga que comprenden el agente de liberación en tiempo liberan los complementos nutricionales después de que se haya ingerido el complemento dietético.

2. El complemento de la reivindicación 1, **caracterizado porque** el complemento se encuentra dentro de una cápsula, una cápsula vegetal o una cápsula de gelatina dura.

3. El complemento la reivindicación 1 o 2, **caracterizado porque** los polisacáridos de cadena larga que comprenden el agente de liberación en tiempo liberan un 85 % de los complementos nutricionales entre 1 y 8 horas después de que se haya ingerido el complemento dietético.

4. El complemento las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** el complemento dietético comprende uno o más excipientes.

5. El complemento las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** el uno o más sacáridos comprende galactosa, galactosamina, glucosamina, glucosa, manosa, manosa acetilada, ácido N-acetilneuramínico, fucosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, arabinosa, arabinogalactano, ácido galacturónico, ácido glucurónico, ácido idurónico, xilosa y mezclas o combinaciones de los mismos.

6. El complemento las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** el complemento dietético está comprimido mediante compactación con rodillos a una presión de 13.789 a 68.940 kPa, preferentemente de 34.473 a 68.940 kPa.

7. El complemento las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** el complemento dietético está comprimido a una presión superior a 68.940 kPa.

8. El complemento las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado porque** el uno o más sacáridos comprende sacáridos del 0,1 al 75 por ciento en peso, preferentemente del 1 al 10 por ciento en peso de cada galactosa, glucosa, manosa, ácido N-acetilneuramínico, fucosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina y xilosa aislados y purificados.

9. El complemento las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado porque** el uno o más polisacárido de cadena larga y los complementos nutricionales están compactador por rodillos a una presión superior a 13.789 kPa.

10. El complemento las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado porque** el desactivador de radicales de oxígeno lipófilo se selecciona entre el grupo que consiste en una o más de vitamina E seleccionada entre el grupo que consiste en tocoferoles alfa, beta, delta, épsilon, gamma, zeta, eta, xi1, xi2 y sigma, y tocotrienoles alfa, beta, delta y gama, análogos de los mismos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y combinaciones de los mismos.

11. El complemento las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado porque** el desactivador de radicales de oxígeno lipófilo se selecciona entre el grupo que consiste en flavonoles, quercetina, caemferol, miricetina, apigenina y derivados, análogos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y combinaciones de los mismos.

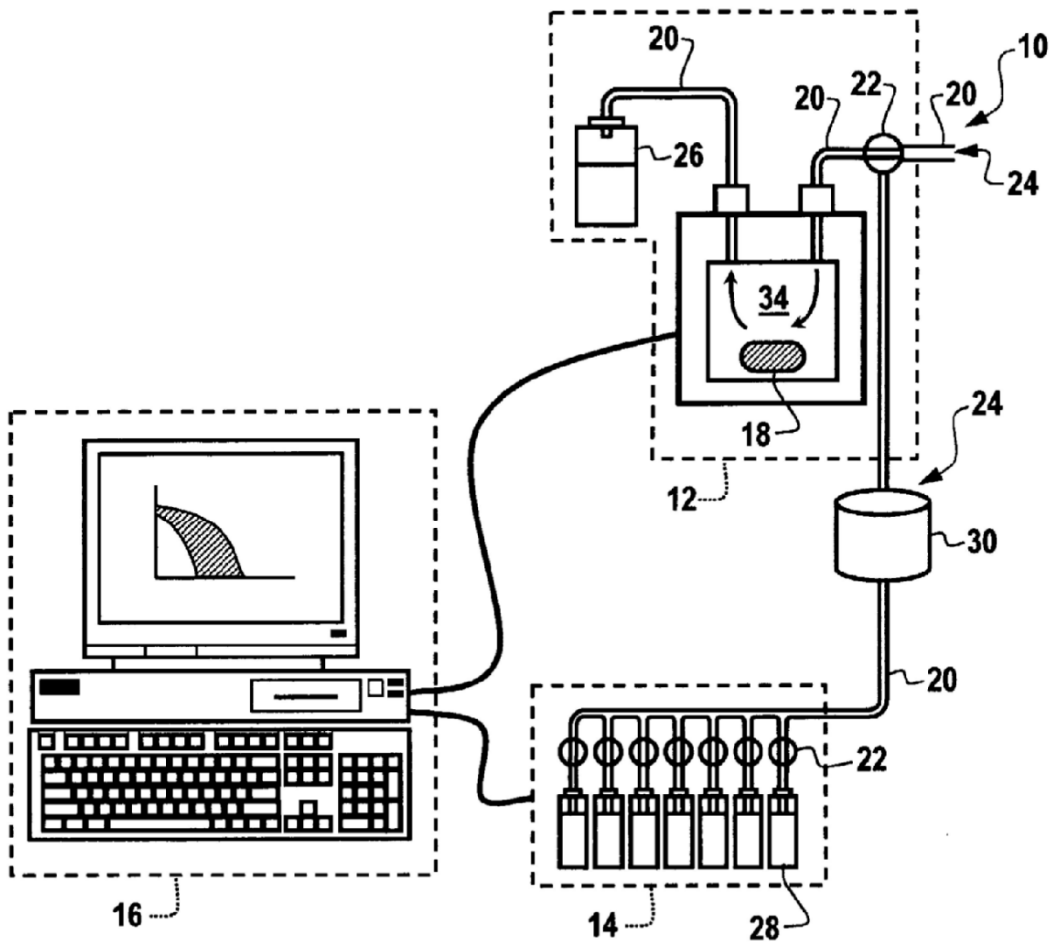
12. El complemento las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado porque** los complementos nutricionales comprenden adicionalmente una cantidad nutricionalmente efectiva de seis o más sacáridos seleccionados entre galactosa, galactosamina, glucosamina, glucosa, manosa, manosa acetilada, ácido N-acetilneuramínico, fucosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, arabinosa, arabinogalactano, ácido galacturónico, ácido glucurónico, ácido idurónico, xilosa y mezclas o combinaciones de los mismos.

13. El complemento las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado porque** el uno o más sacáridos comprende galactosa, manosa, fucosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina y xilosa aislados y purificados.

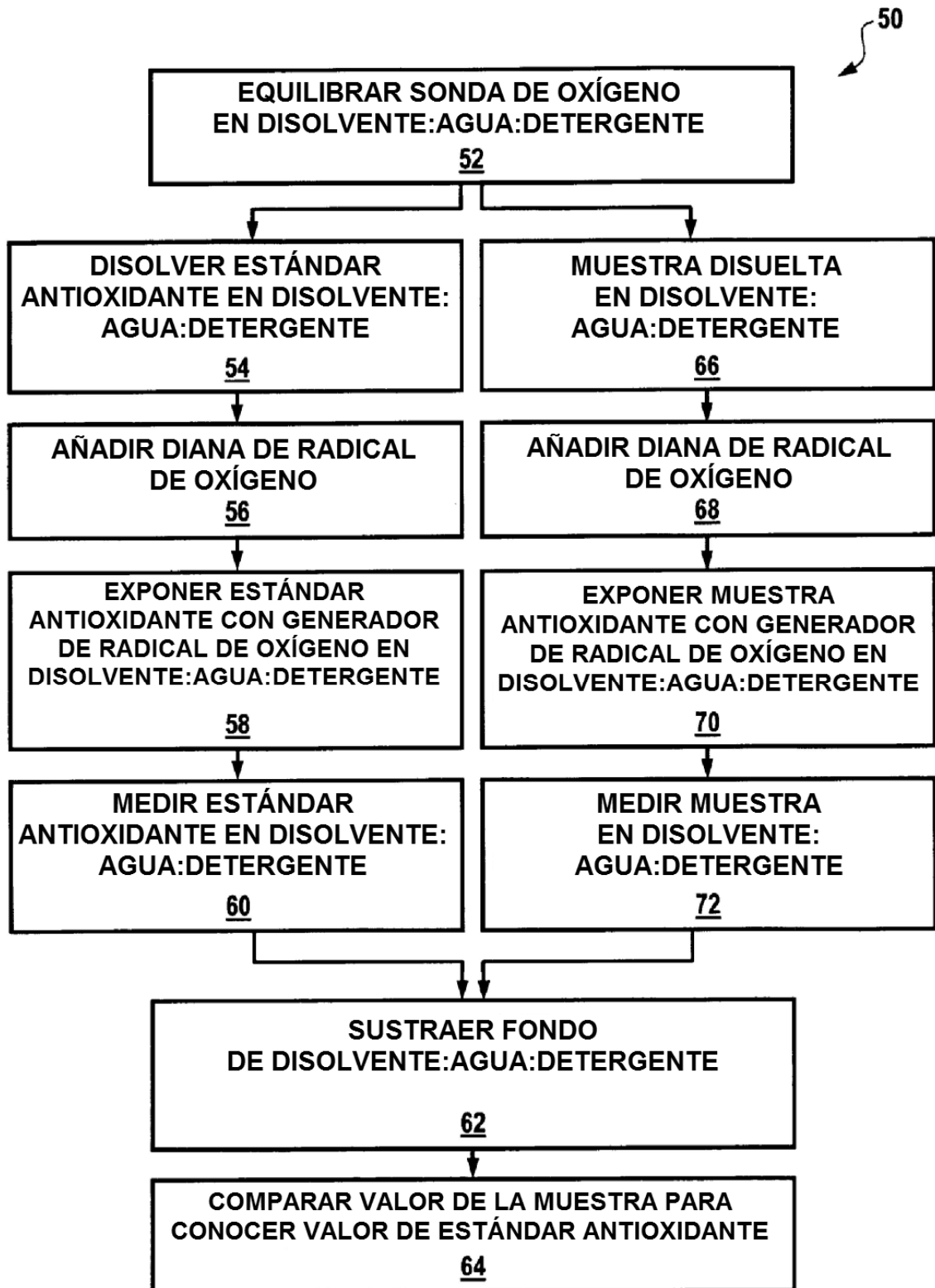
14. El complemento las reivindicaciones 1 a 13, **caracterizado porque** el uno o más sacáridos comprende de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 10 por ciento en peso de cada uno de galactosa, glucosa, manosa, ácido N-acetilneuramínico, fucosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina y xilosa aislados y purificados.
- 5 15. El complemento las reivindicaciones 1 a 14, **caracterizado porque** los polisacáridos de cadena larga comprenden de entre 2 a 50.000 monómeros, preferentemente de 200 a 50.000 monómeros, más preferentemente de 2.000 a 50.000 monómeros.
16. El complemento las reivindicaciones 1 a 15, **caracterizado porque** el desactivador de radical de oxígeno lipófilo y lipófilo cuando se proporciona a un paciente proporciona un aumento de más del 13 % según se midió mediante ORAC( $\beta$ -PE) a partir del nivel de antioxidante del valor basal del paciente.
- 10 17. El complemento las reivindicaciones 1 a 16, **caracterizado porque** el desactivador de radicales de oxígeno lipófilo y lipófilo comprende entre aproximadamente el 1 y el 30 por ciento en peso del complemento.
- 15 18. El complemento las reivindicaciones 1 a 17, comprende uno o más antioxidantes lipófilos y uno o más antioxidantes lipófilos, **caracterizado porque** el complemento está compactado con rodillos a una presión superior a 34.473 kPa y el 85 % de los complementos nutricionales se libera de entre 2 a 6 horas y los antioxidantes lipófilos y lipófilos combinados tienen un valor de oxígeno disuelto superior a 6.000  $\mu$ Mol de Equivalentes de Trolox (ET)/gramo.
19. Un procedimiento de fabricación de un complemento dietético de liberación modificada que comprende las etapas de:
- 20 mezclar uno o más polisacáridos de cadena larga y una cantidad nutricionalmente efectiva de uno o más complementos nutricionales seleccionados entre antioxidantes, vitaminas, minerales, aminoácidos, ácidos nucleicos, extractos herbales, mezclas y combinaciones de los mismos, en el que los polisacáridos de cadena larga comprenden tanto un agente de liberación en tiempo para moléculas bioactivas como una porción del complemento dietético,
- 25 en el que uno o más de complementos nutricionales comprende antioxidantes que comprenden un desactivador de radical de oxígeno lipófilo aislado y purificado y un desactivador de radical de oxígeno lipófilo aislado y purificado, en el que los desactivadores de radical de oxígeno lipófilo y lipófilo tienen un valor de desactivador de radical de oxígeno superior a 6.000  $\mu$ Mol de Equivalentes Trolox (ET)/gramo; y
- 30 en el que la compresión del complemento dietético a una presión superior a 13.789 kPa, en el que los polisacáridos de cadena larga que comprenden el agente de liberación en tiempo liberan los complementos nutricionales después de que se haya ingerido el complemento dietético.
20. El procedimiento de la reivindicación 19, **caracterizado porque** el complemento se coloca dentro de una cápsula externa, una cápsula vegetal o una cápsula de gelatina dura.
21. El procedimiento de las reivindicaciones 19 o 20, **caracterizado porque** los polisacáridos de cadena larga que comprenden el agente de liberación en tiempo liberan un 85 % de los complementos nutricionales entre 1 y 8 horas después de que se haya ingerido el complemento dietético.
- 35 22. El procedimiento de las reivindicaciones 19 a 21, **caracterizado porque** el complemento comprende adicionalmente uno o más excipientes.
23. El procedimiento de las reivindicaciones 19 a 22, **caracterizado porque** el uno o más sacáridos comprende galactosa, galactosamina, glucosamina, glucosa, manosa, manosa acetilada, ácido N-acetilneuramínico, fucosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina y xilosa o combinaciones de los mismos.
- 40 24. El procedimiento de las reivindicaciones 19 a 23, en el que el complemento dietético está comprimido a una presión de 13.789 a 68.940 kPa, preferentemente de 34.473 a 68.940 kPa.
25. El procedimiento de las reivindicaciones 19 a 23, **caracterizado porque** el complemento dietético está comprimido a una presión superior a 68.940 kPa.
- 45 26. El procedimiento de las reivindicaciones 19 a 25, **caracterizado porque** la compresión es mediante compactación con rodillos.
27. El procedimiento de las reivindicaciones 19 a 26, **caracterizado porque** el uno o más sacáridos comprende sacáridos del 0,1 al 75 por ciento en peso, preferentemente del 1 al 10 por ciento en peso, de cada una de galactosa, glucosa, manosa, ácido N-acetil-neuramínico, fucosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina y xilosa aislados y purificados.
- 50 28. El procedimiento de las reivindicaciones 19 a 27, **caracterizado porque** el uno o más polisacáridos de cadena larga se seleccionan entre goma tragacanto, goma guar, harina de cereal, extracto de árbol de alerce, extracto de aloe vera, goma gati, almidón, goma arábica, goma de xantano, sulfato de condroitina, polimannosa acetilada, mezclas y combinaciones de los mismos.

5 29. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 28, **caracterizado porque** el desactivador de radicales de oxígeno lipófilo se selecciona entre el grupo que consiste en una o más de vitamina E seleccionada entre el grupo que consiste en tocoferoles alfa, beta, delta, épsilon, gamma, zeta, eta, xi1, xi2 y sigma, y tocotrienoles alfa, beta, delta y gama, análogos de los mismos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y combinaciones de los mismos.

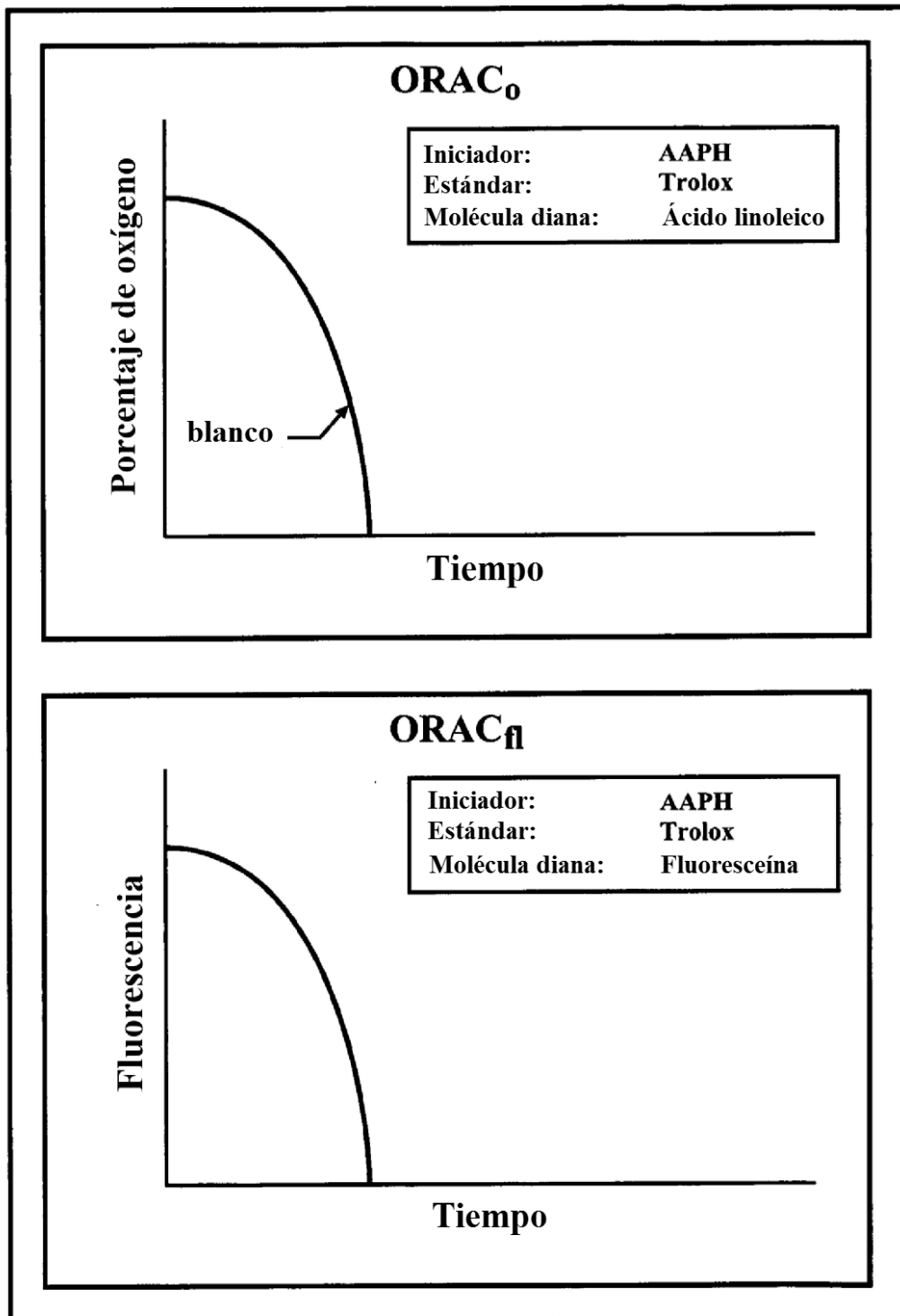
10 30. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 29, **caracterizado porque** el desactivador de radicales de oxígeno lipófilo se selecciona entre el grupo que consiste en flavonoles, quercetina, caemferol, miricetina, apigenina y derivados, análogos, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y combinaciones de los mismos.



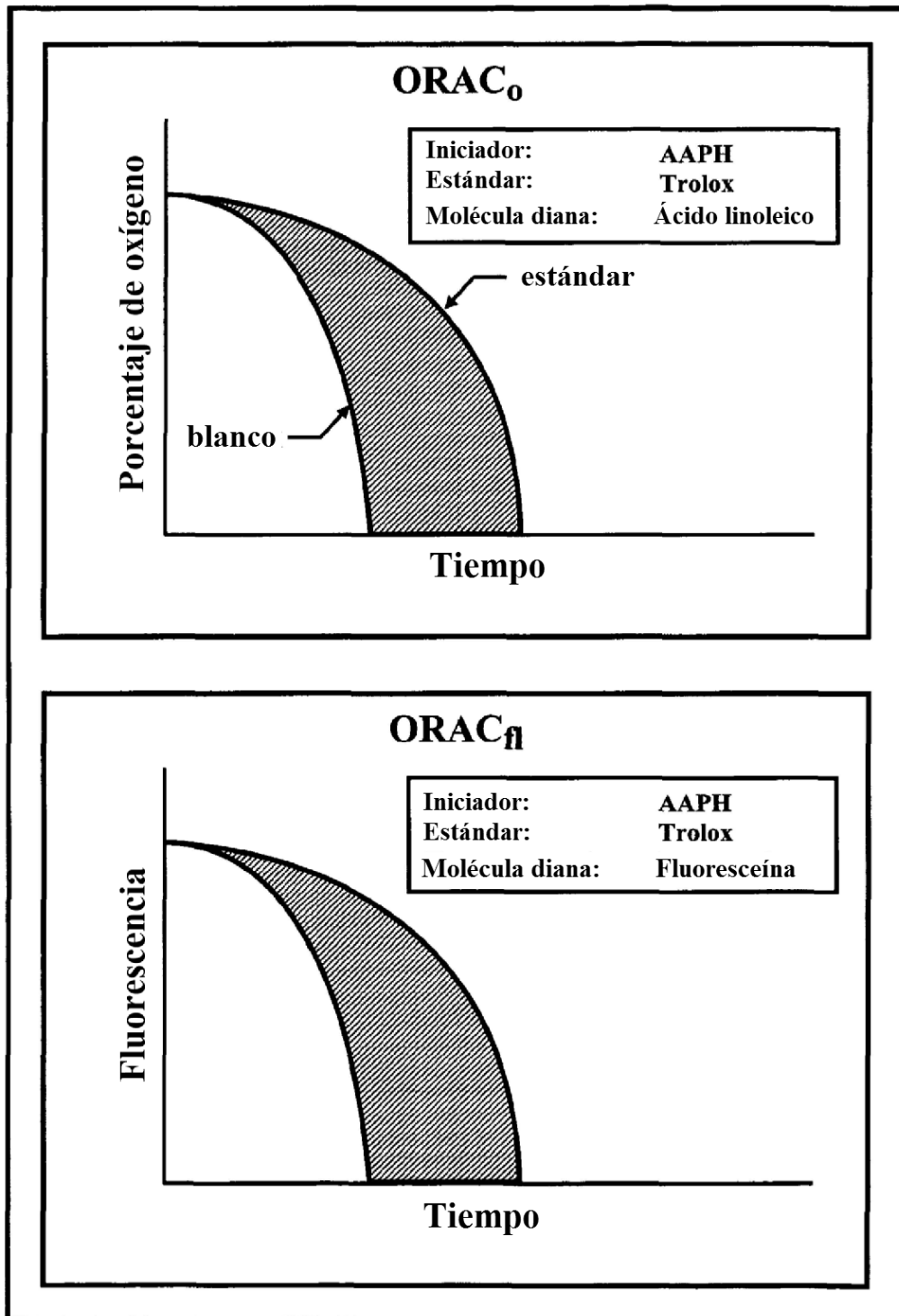
*Fig. 1*



*Fig. 2*

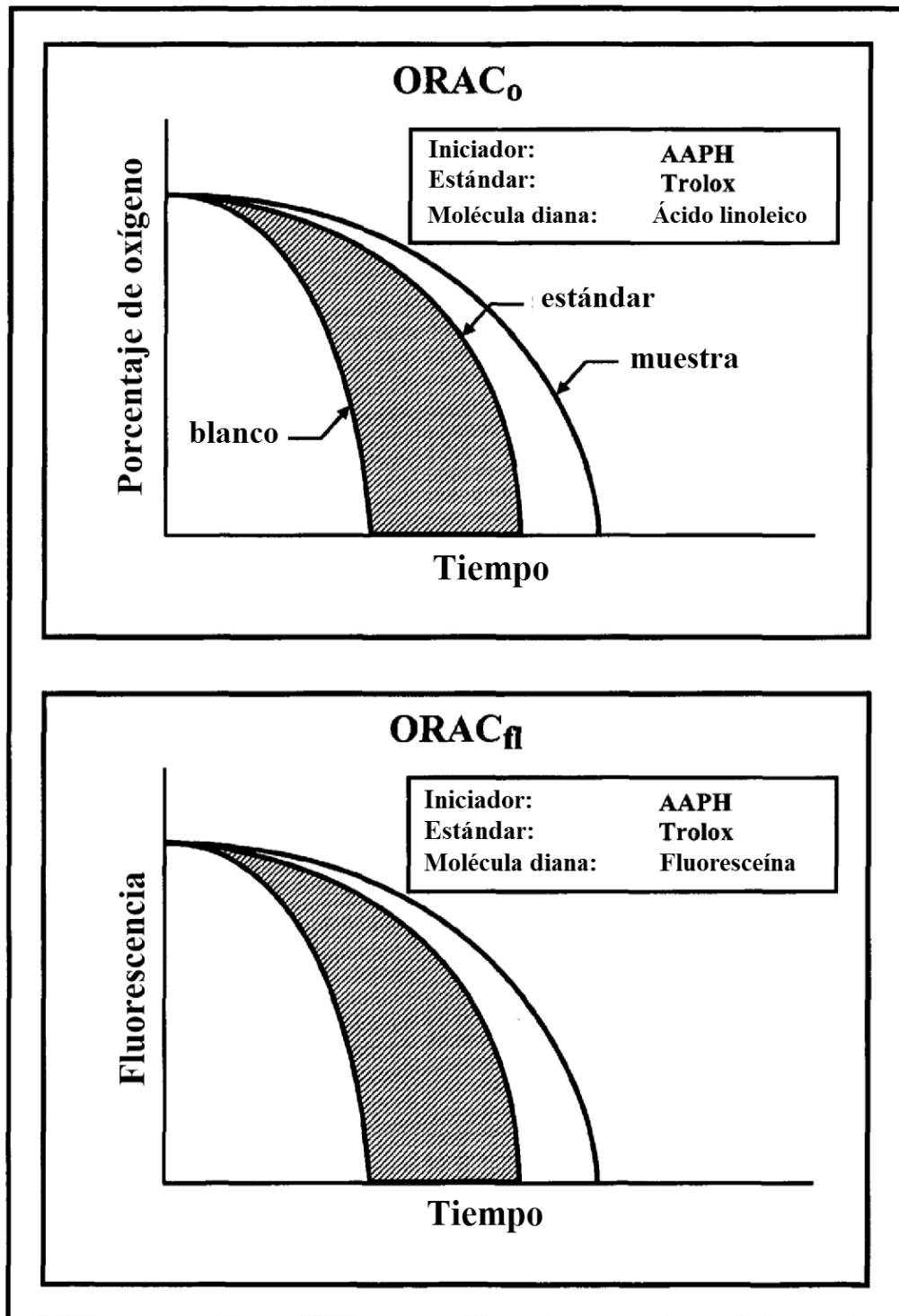


*Fig. 3*



*Fig. 4*





*Fig. 5*

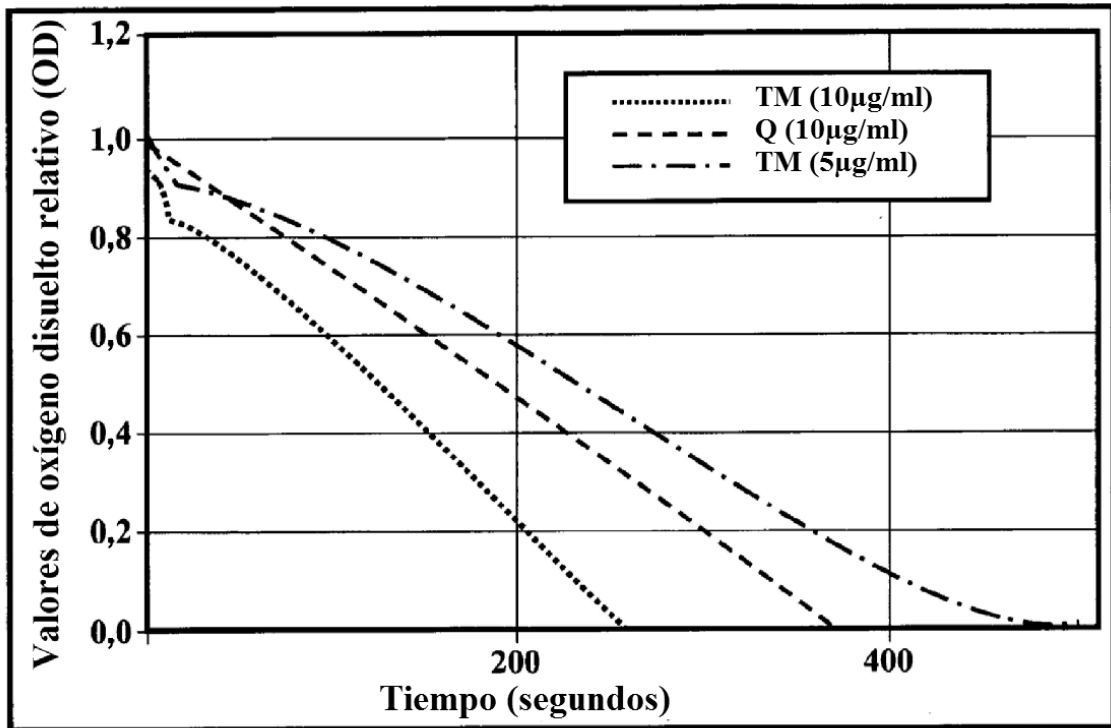


Fig. 6

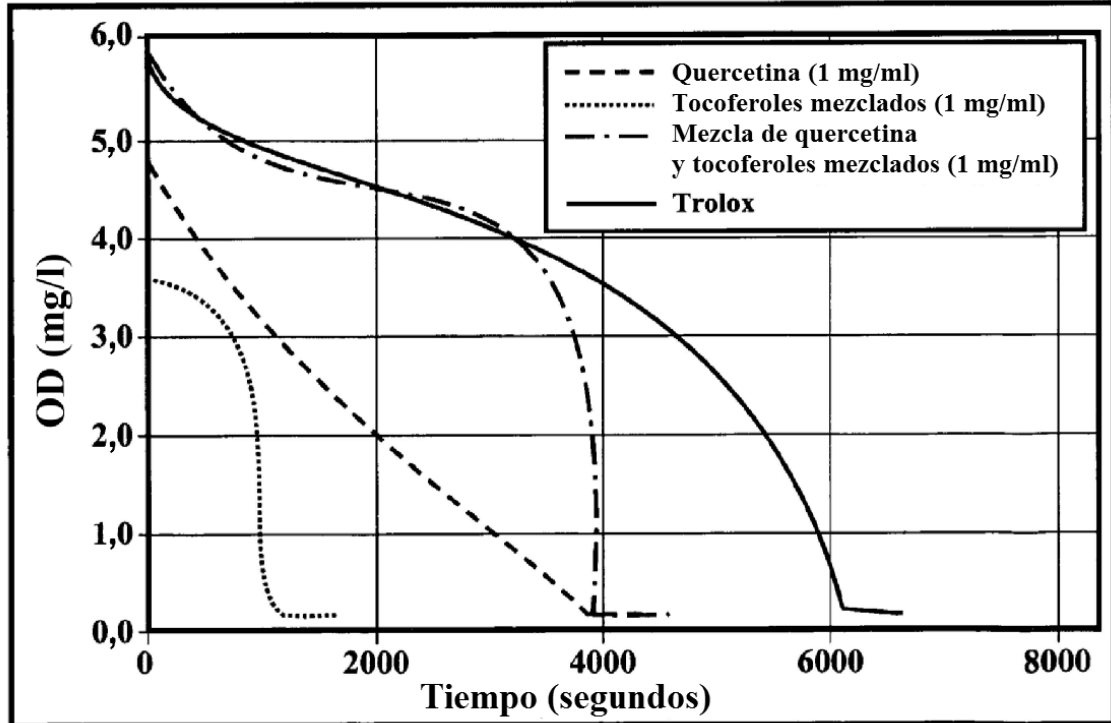
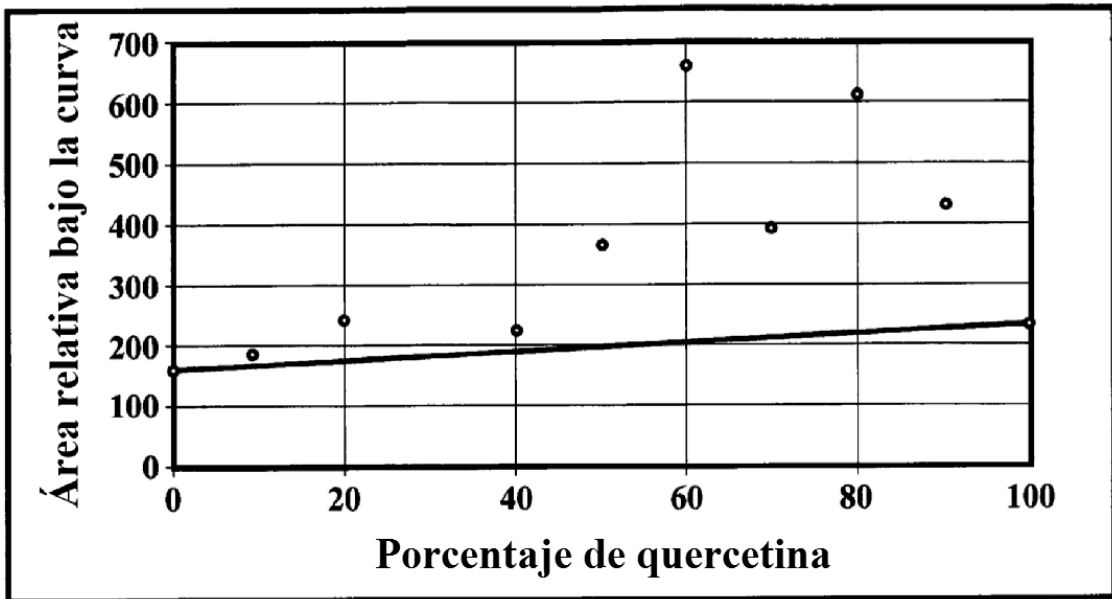
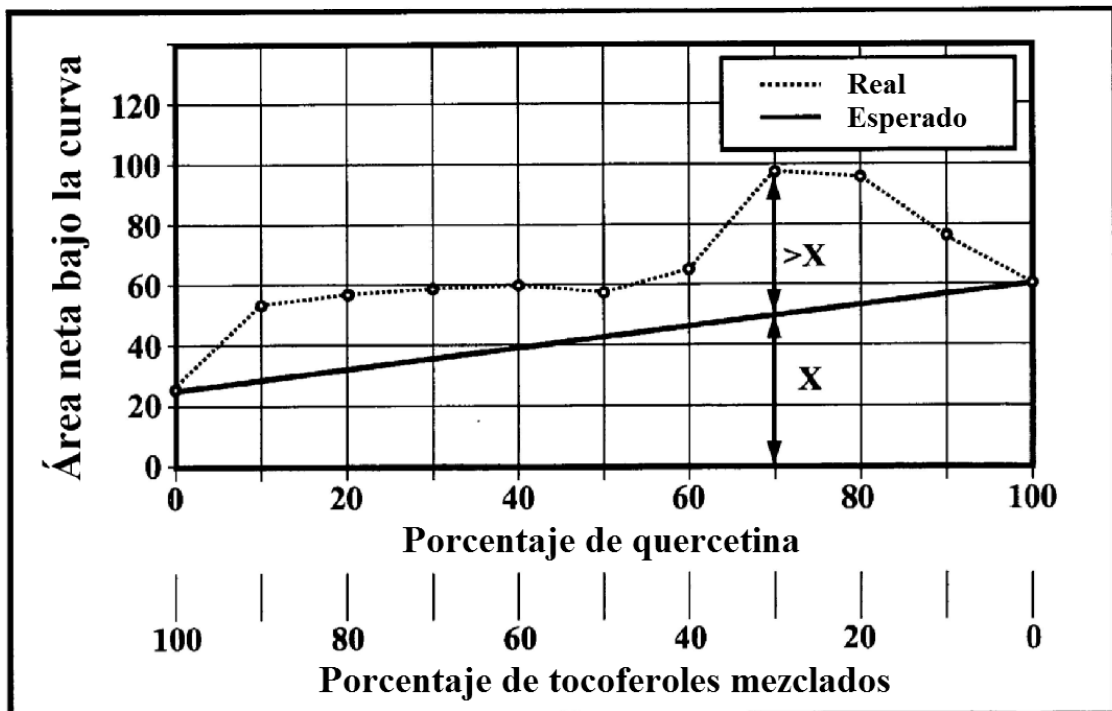


Fig. 7



*Fig. 8*



*Fig. 9*

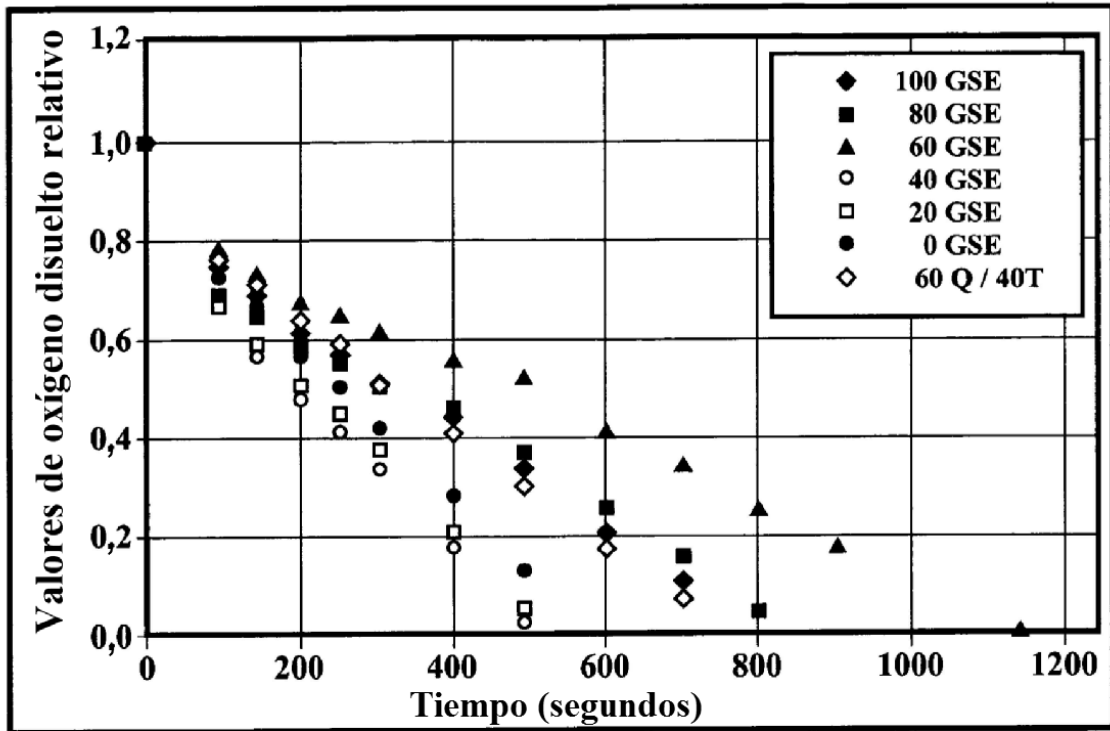


Fig. 10

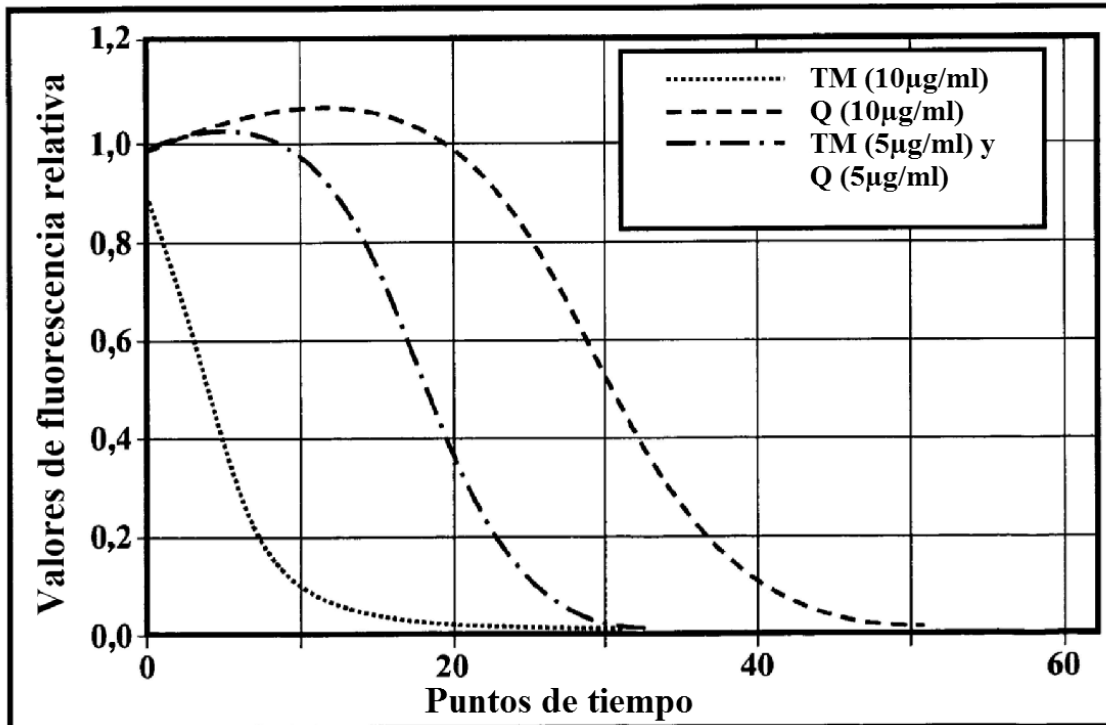
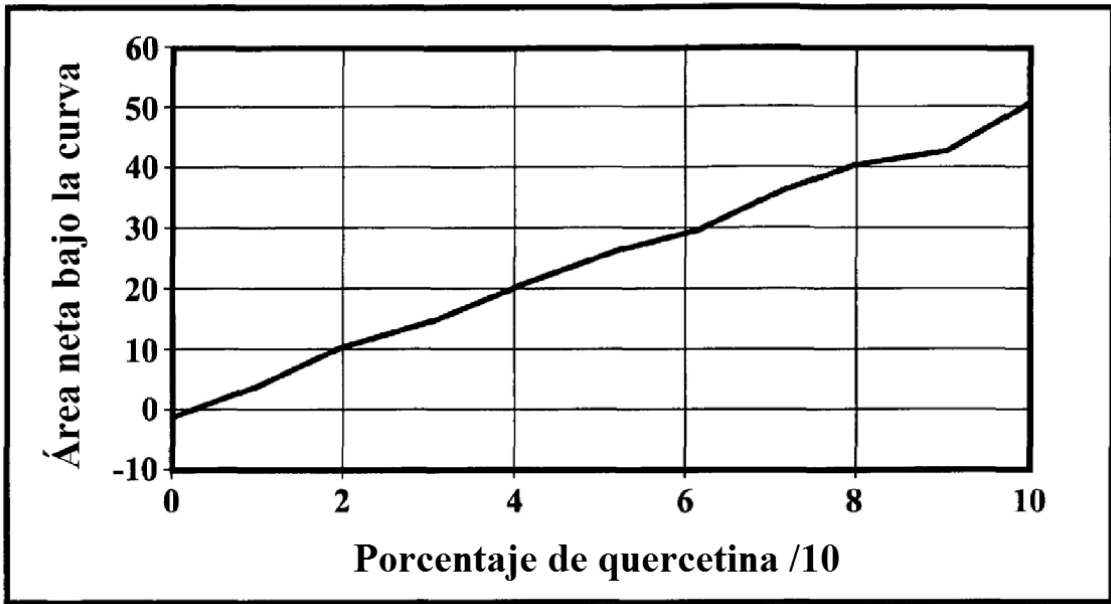
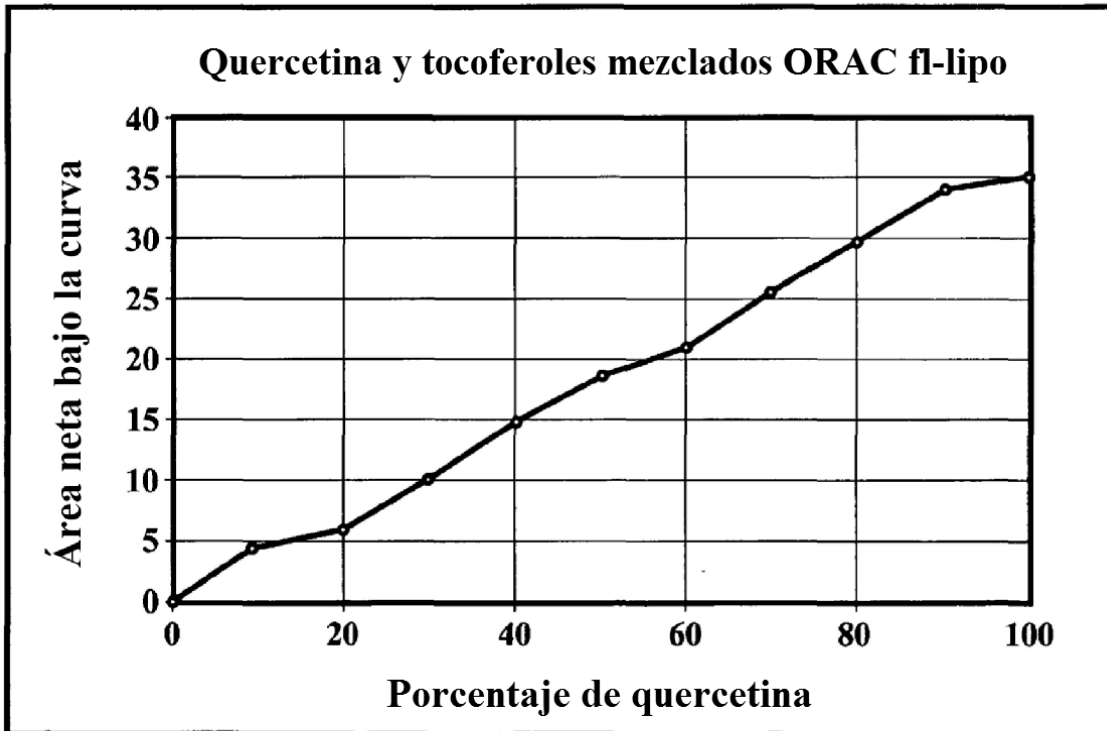


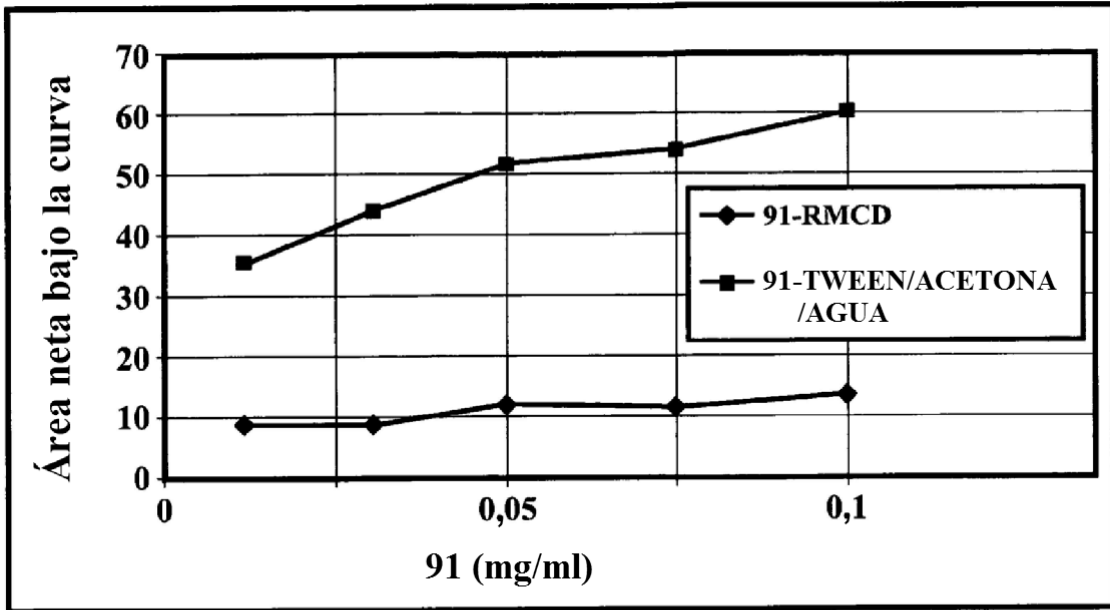
Fig. 11



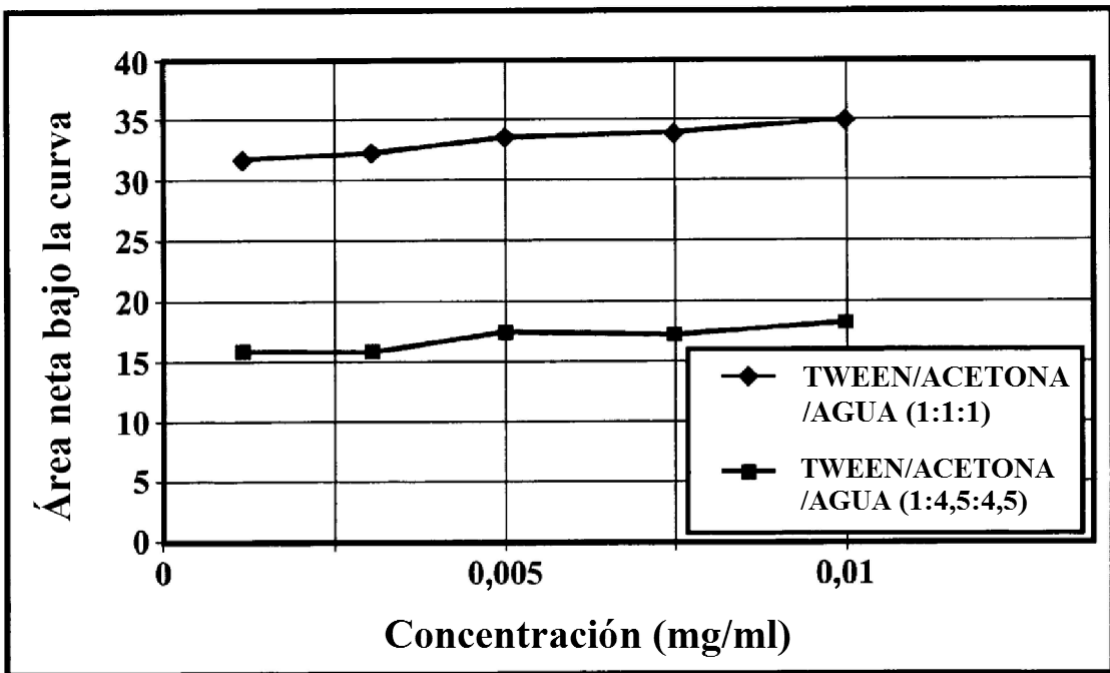
*Fig. 12A*



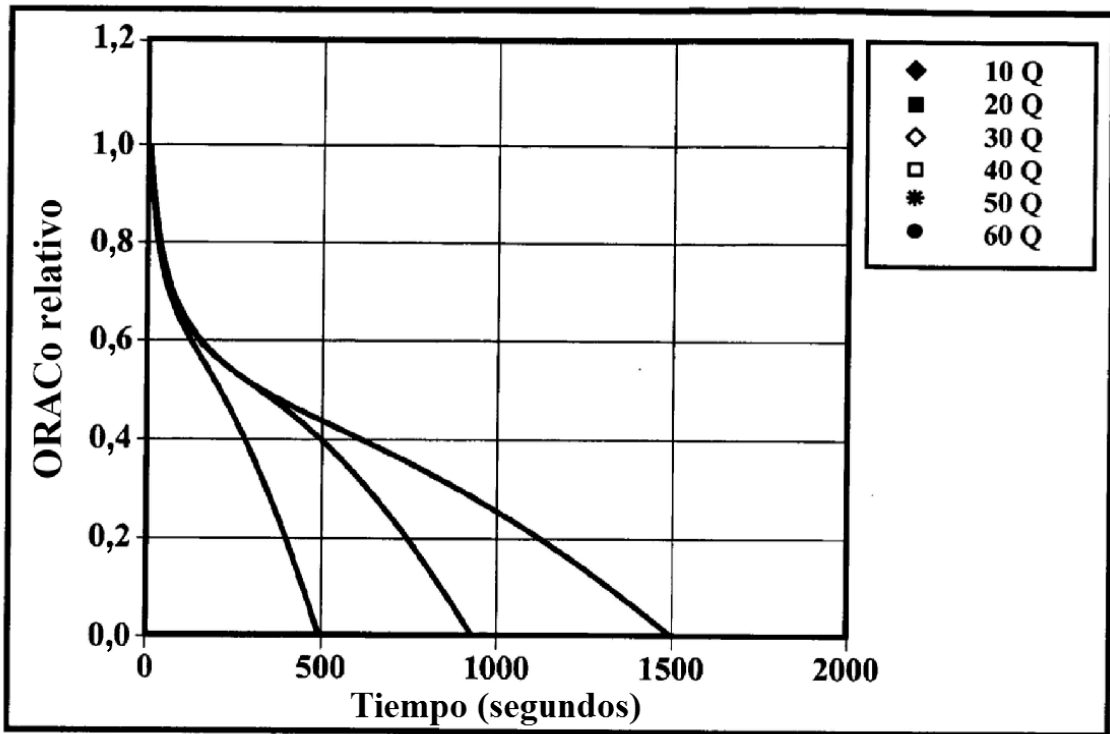
*Fig. 12B*



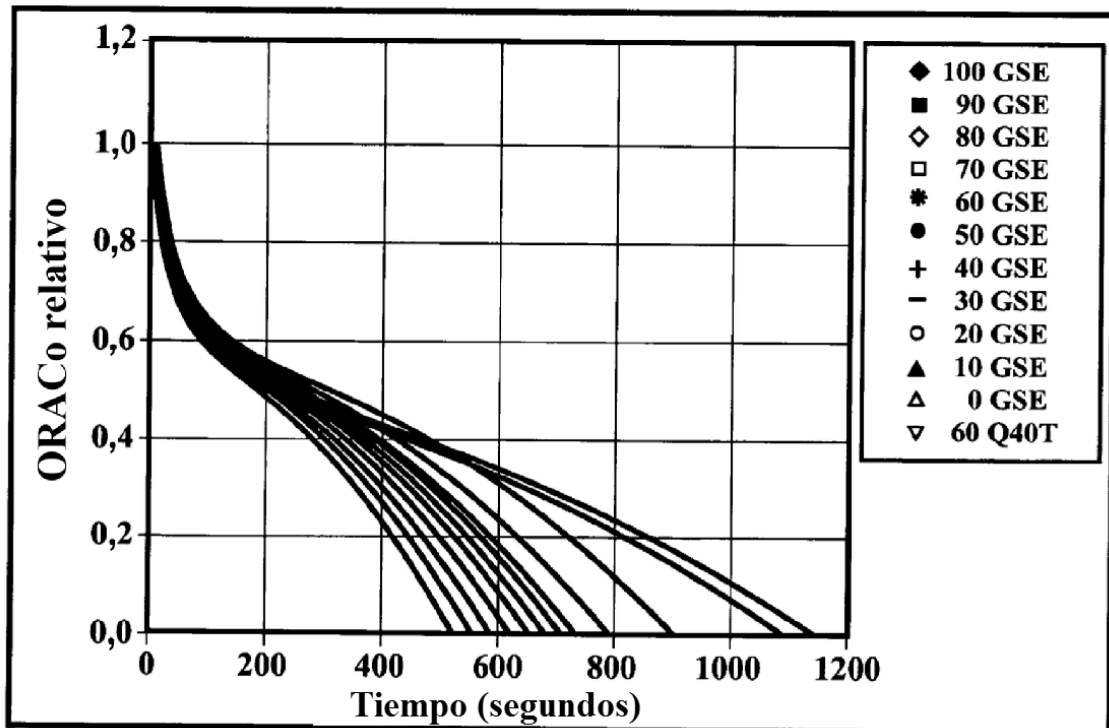
*Fig. 13*



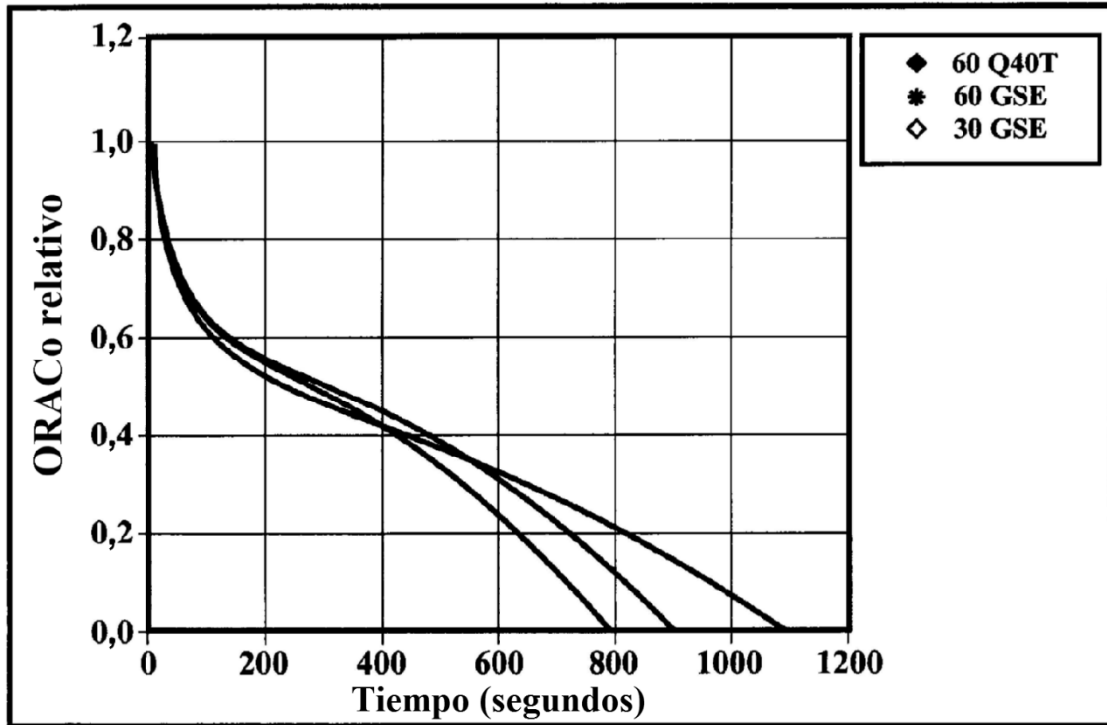
*Fig. 14*



*Fig. 15*



*Fig. 16*



*Fig. 17*



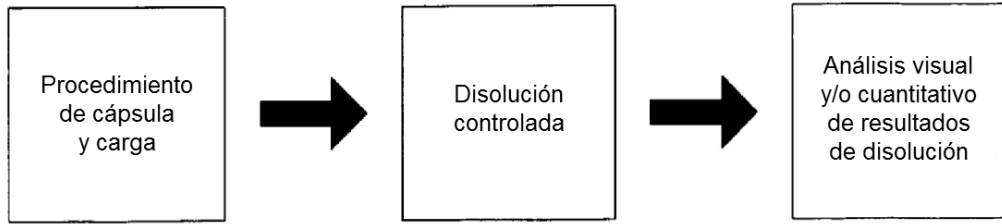


Figura 18

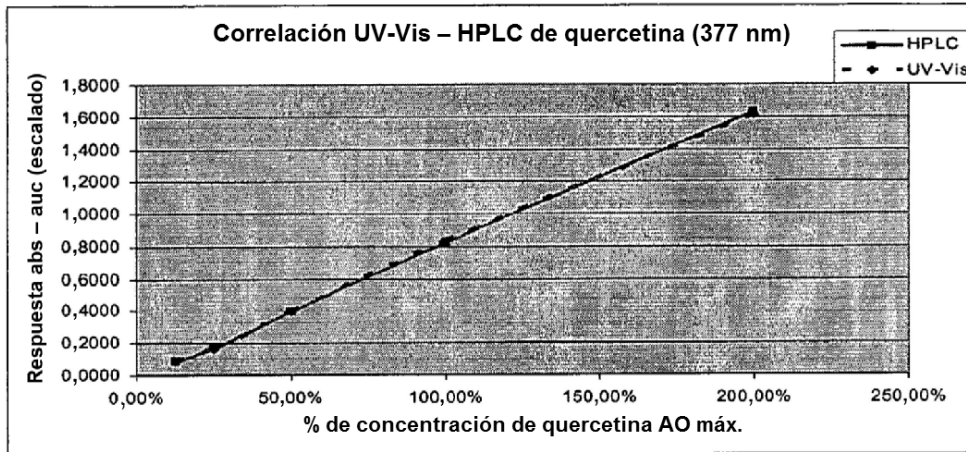


Figura 19

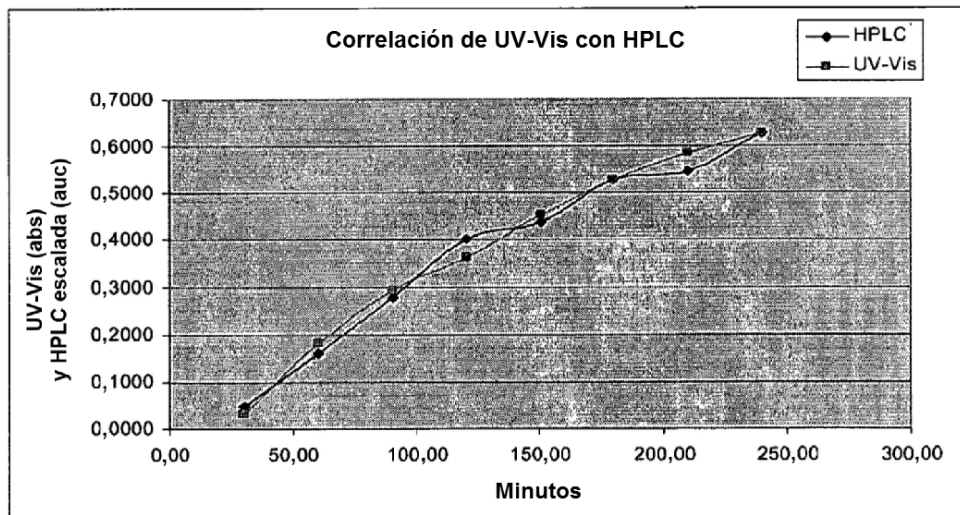


Figura 20