(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 151 401**

(21) Número de solicitud: 009801290

(51) Int. Cl.[7]: C12Q 1/28

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación: **19.06.1998**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **16.12.2000**

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud: **16.12.2000**

(71) Solicitante/s: **UNIVERSIDAD DE MURCIA**
Avda. Teniente Flomesta, s/n
Edificio Convalecencia, 3 Planta
30003 Murcia, ES

(72) Inventor/es: **Bañón Arnao, Marino;**
Cano Lario, Antonio;
Acosta Echevarría, Manuel y
García Cánovas, Francisco

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

(54) Título: **Método de valoración del potencial antioxidante en alimentos.**

(57) Resumen:
Método de valoración del potencial antioxidante en alimentos.
Comprende determinar espectrofotométricamente la interacción entre una muestra problema y un sistema cromóforo constituido por ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) y su correspondiente radical.
El método se lleva a cabo adicionando dicha muestra problema sobre una cantidad conocida de dicho sistema cromóforo, previamente formado enzimáticamente, en una disolución tamponada, y estimando las pérdidas de absorbancia a una determinada longitud de onda λ.
Aplicación en el sector de la Industria Alimentaria.

ES 2 151 401 A1

DESCRIPCION

Método de valoración del potencial antioxidante en alimentos.

Campo técnico de la invención

La presente invención se encuadra dentro del sector de la Industria Alimentaria.

Más concretamente, la presente invención se refiere al campo técnico de los métodos analíticos para la valoración del potencial antioxidante de los alimentos.

En esta línea, la presente invención propone un nuevo método analítico con el que es posible valorar el potencial antioxidante de una amplia gama de alimentos con una técnica que se caracteriza por su sencillez de ejecución y equipamiento, por su rapidez y por su reproducibilidad.

Estado de la técnica anterior de la invención

Los alimentos, además de aportar la energía necesaria para la vida incorporan otros muchos componentes necesarios o, al menos, beneficiosos para la salud humana tales como fibra, minerales, aminoácidos esenciales, vitaminas, etc.

Cada vez aumenta más el interés científico por los estudios clínicos y epidemiológicos que correlacionan la ingesta de determinados alimentos o componentes de los mismos con la prevención o incidencia de ciertas enfermedades (cardiovasculares, visuales, neurológicas, cáncer, envejecimiento, etc.).

Actualmente se empieza a dar gran importancia a los componentes con carácter antioxidante de los alimentos. Dentro de esta categoría se encuadran una amplia diversidad de sustancias tales como determinadas vitaminas, carotenoides, flavonoides, ácidos fenólicos, etc.

Por otra parte, como es sabido, en la industria alimentaria es habitual el empleo de sustancias antioxidantes como conservantes de determinados alimentos. De aquí que dicha industria haya desarrollado y utilizado técnicas analíticas sofisticadas para conocer el contenido de compuestos antioxidantes en los alimentos.

Sin embargo, actualmente y debido entre otras razones a las restricciones legales en el empleo de antioxidantes artificiales, se empieza a manifestar un interés cada vez mayor por la medida del denominado Potencial Antioxidante de un determinado producto alimenticio.

Existen diversas metodologías y técnicas para la determinación de parámetros similares pero todas ellas presentan desventajas o inconvenientes frente al método de la presente invención.

Entre las desventajas más evidentes de muchos de los ensayos y técnicas actuales para la determinación de parámetros similares al potencial antioxidante están: el uso de técnicas de detección más complejas como la fluorimetría, la oximetría y la quimioluminiscencia; el empleo de ensayos químicos con escasa estabilidad y reproducibilidad, debido a que requieren exhaustivos controles de temperatura y/o tiempos de reacción; en el caso de algunos métodos espectrofotométricos en particular se deben utilizar técnicas de purificación de proteínas con serias limitaciones en cuanto a la sensibilidad y reproducibilidad del método. Además, muchos de estos métodos presentan importantes interferencias debido a la presencia en las muestras de actividades enzimáticas como peroxidasas, polifenoloxidasas, superóxidodismutasas, etc. Generalmente, no permiten las valoraciones del potencial antioxidante (o parámetros similares) en disoluciones con distintos valores de pH, con lo que no se pueden efectuar estudios particulares sobre esta variable.

Descripción detallada de la invención

La presente invención, tal y como se indica en su enunciado, se refiere a un método para la valoración del potencial antioxidante en alimentos.

El potencial antioxidante es un parámetro que cuantifica la capacidad de una muestra compleja (muestra biológica, producto natural, producto artificial, alimento, etc.) para captar radicales libres en un medio acuoso. Así considerado, el potencial antioxidante es una característica global del producto, independiente de su composición particular.

La medida del potencial antioxidante, permite el control y caracterización de materias primas, el seguimiento y control de los procesos industriales, el control de los productos almacenados, etc.

La presente invención proporciona un método para la determinación del potencial antioxidante de un producto alimenticio sólido o líquido que aporta importantes ventajas frente a las metodologías ya existentes para la determinación de parámetros similares. Entre las referidas ventajas cabe destacar la rapidez y sencillez de ejecución y aplicación, la amplia gama y diversidad de productos susceptibles de poderse analizar, la simplicidad instrumental y el gran interés industrial en diversos sectores.

El método de valoración objeto de la presente invención es un método colorimétrico basado en la capacidad de las sustancias antioxidantes para revertir el equilibrio existente entre un compuesto cromóforo y su correspondiente radical, según el esquema:

CROMÓ-	⟵	CROMÓFORO-
FORO	⟶	RADICAL

ANTIOXIDANTE

Los reactivos utilizados en el método constituyente de la invención son los siguientes:

- Peroxidasa: enzima que cataliza la reacción entre un sustrato reductor y peróxido de hidrógeno para generar radicales libres.

- Peróxido de hidrógeno: sustrato oxidante específico para dicha peroxidasa.

- ABTS® : ácido 2,2'-atino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) que se emplea como reactivo cromóforo. El ABTS® es un agente reductor que permite medir la actividad peroxidasa en distintos materiales. Se caracteriza por su gran solubilidad en agua, su alta estabilidad química y por tener un espectro de absorción en la zona visible. El producto de su reacción catalizada por peroxidasa es un radical estable con un alto coeficiente de extinción, el cual es generado

directamente a partir de su precursor. Los espectros de absorción del ABTS y de su producto de oxidación ($ABTS^+$) se muestran en la Figura 1.

El método de la invención se lleva a cabo adicionanado la muestra problema a analizar, a una cantidad conocida del radical de ABTS, previamente formado enzimáticamente en un medio de reacción que contiene ABTS, peróxido de hidrógeno y enzima peroxidasa en una disolución tamponada.

La reacción se sigue espectrofotométricamente, estimando las pérdidas de absorbancia a una determinada longitud de onda λ, (A_λ nm) debidas a la presencia de los antioxidantes en la muestra problema.

Además, se emplea un compuesto antioxidante patrón, con el cual se elabora una recta de calibrado que relaciona las pérdidas de $A_{\lambda nm}$ con la concentración conocida de dicho patrón.

De este modo se calcula el potencial antioxidante de la muestra como la concentración, expresada en mg/100mL, de patrón, que produce el mismo efecto antioxidante que la mezcla problema que se está analizando.

Una de las principales ventajas que proporciona el método de la presente invención es su gran versatilidad. Así, es posible valorar el potencial antioxidante de una muestra problema en distintas condiciones de pH, pudiendo presentar la disolución tamponadora en donde transcurre la reacción valores de pH comprendidos entre 3,0 y 8,0.

Por su parte, la longitud de onda (lambda) a la cual se efectúan las mediciones puede estar comprendida entre 400 y 700 nm, siempre y cuando se cuantifiquen las posibles interferencias a cada longitud de onda.

Como antioxidante patrón se pueden utilizar ácido Lascórbico, Trolox (un análogo de la vitamina E), flavonoides (naringina, quercetina, diosmina, etc.), ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido cafeico, ácido p-cumárico, etc.) y otros compuestos como el resveratrol, sinigrina, etc.

Otras ventajas destacables del método analítico de la presente invención son las siguientes:

- Es fácilmente automatizable
- No precisa de protocolos de aislamiento y purificación
- Utiliza reactivos comerciales de fácil adquisición
- Evita las interferencias que experimentan otros métodos analíticos relacionados, ya que evita la presencia de actividad peroxidasa en las muestras
- Presenta un amplio rango de trabajo
- No requiere exhaustivos controles de temperatura y tiempo de reacción
- Presenta una excelente reproducibilidad
- Presenta bajos límites de detección y cuantificación (por ejemplo, se pueden conseguir valores como LOD = 0,15 nmoles y LOQ = 0,38 nmoles de ácido L-ascórbico)

El método de la presente invención es aplicable a cualquier tipo de alimento sólido o líquido, o bebida apta para el consumo humano. Más concretamente, es especialmente adecuado para los siguientes productos:

- Zumos de frutas (naranja, limón, pomelo, manzana, uva, piña, etc.) tanto frescos como envasados
- Vinos blancos, rosados y tintos
- Cervezas
- Refrescos
- Infusiones
- Bebidas isotónicas
- Extractos vegetales de frutas, hortalizas, etc.

El método de la presente invención tiene especial aplicación en los sectores de las industrias químicofarmacéutica, de aditivos alimentarios y de productos alimenticios. También tiene interés para las Cooperativas Agrarias.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1: Espectro de absorción W del ABTS y de su producto de oxidación ($ABTS^+$).

Fig. 2: Representación gráfica de los registros de las reacciones de ácido L-ascórbico y del radical del ABTS.

Fig. 3: Representación gráfica de la recta de calibrado construida con un patrón de ácido L-ascórbico.

Modos de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

Ejemplo 1

Ensayo del Potencial Antioxidante. Condiciones y recta de calibrado

Las condiciones genéricas del método de ensayo optimizadas son las siguientes:

- 5 mM de ABTS®
- 0,1 mM de H_2O_2 y
- 5 nM de Peroxidasa,

todo ello disuelto en un volumen final de 2 mL de la disolución tamponadora seleccionada para el valor de pH que interese.

No obstante, el procedimiento puede simplificarse formando una cantidad de radical de ABTS manteniendo las relaciones de concentraciones, siguiendo los pasos que se indican a continuación:

Paso 1. Preparación de 20 mL de radical del ABTS según el siguiente protocolo: Se pesan 0,055 g de ABTS® y se diluyen en 19,970 mL del tampón seleccionado. Se adicionan 20 μL de peróxido de hidrógeno

0,1 mM y 10 μL de peroxidasa a una concentración de 10 μM. El volumen final de la reacción es 20 mL. Se deja evolucionar la reacción durante 20 minutos. De este modo se tiene preparado medio de reacción en cantidad suficiente para un total de 10 determinaciones de potencial antioxidante.

Paso 2. *Preparación de las muestras de ácido L-ascórbico.*

Se disolvieron 0,007 g de ácido L-ascórbico en un volumen de agua purificada para obtener una concentración final 2 mM. Esta disolución se utilizará para obtener la recta patrón a utilizar en las determinaciones posteriores del potencial antioxidante.

Paso 3. *Obtención de la recta de calibrado.*

En una cubeta espectro fotométrica, se colocan 2 mL de la solución obtenida en el paso 1 conteniendo el radical del ABTS formado en el paso 1. Se determina el valor de la absorbancia a 700 nm. Tras unos 30 segundos, se adicionan volúmenes de la disolución patrón de ácido ascórbico preparada en el paso 2. Se deja evolucionar la absorbancia durante 5 minutos midiéndose el valor de la absorbancia al final del ensayo. La Figura 2 muestra registros de las reacciones del ácido ascórbico y del radical del ABTS.

Con los datos de la absorbancia inicial y final a 700 nm se calculan los descensos de absorbancia mediante diferencia entre los valores obtenidos a los 30 segundos y a los 5 minutos, para cada adición de patrón. Estos descensos de absorbancia se representan frente a las concentraciones de ácido L-ascórbico adicionado, y se construye la recta de calibrado representada en la Figura 3.

Ejemplo 2

Medida del Potencial Antioxidante en zumos de cítricos

Se prepararon zumos de naranja, limón y pomelo de forma convencional. Se filtraron las muestras a través de Miracloth o celulosa. Se adicionaron alícuotas (5-15 μL) de las muestras filtradas a una cubeta con 2 mL de la solución cromófora obtenida en el paso 1 del Ejemplo 1 y se registraron los descensos de absorbancia (700 nm) provocados por el potencial antioxidante de la muestra. Estos descensos de absorbancia se transforman en equivalentes de ácido ascórbico utilizando la recta de calibrado (obtenida en el paso 3 del Ejemplo 1) . De esta forma se determina el potencial antioxidante de la muestra como la concentración, expresada en mg/100 mL de ácido L-ascórbico patrón que produce el mismo efecto antioxidante que la muestra problema que se está analizando. Las medidas se realizan por triplicado. Los datos obtenidos se muestran en la siguiente Tabla 1:

TABLA 1

Zumo	Potencial Antioxidante[a]
Naranja	40, 3 $\pm$ 0, 3
Limón	61,2 $\pm$ 0,3
Pomelo	38, 6 $\pm$ 0, 1

[a]Potencial antioxidante estimado como equivalentes de ácido ascórbico (mg/100 mL)

Ejemplo 3

Medida del Potencial Antioxidante de sustancias puras.

Se determinó el potencial antioxidante de una serie de compuestos puros siguiendo un protocolo similar al del Ejemplo 1.

Para ello se prepararon disoluciones 2 mM de los compuestos a analizar.

En un cubeta se adicionan 2 mL del radical de ABTS preformado (paso 1), se añaden después alícuotas del compuesto problema y se registra la absorbancia a 700 nm siguiendo el protocolo del paso 3 en el ejemplo 1.

Los valores del potencial antioxidante resultantes de estos análisis se muestran en la siguiente Tabla 2. Los resultados van referidos a los valores del potencial antioxidante de disoluciones de ácido ascórbico a la misma concentración.

TABLA 2

Sustancia	Potencial Antioxidante Relativo[a]
TROLOX	1,00
α-tocoferol	1,00
Glutatión	0,99
Ácido gálico	2,99
Etanol	sin efecto

[a]Potencial Antioxidante de la Sustancia/ Potencial Antioxidante del ácido ascórbico (ambos a la misma concentración)

REIVINDICACIONES

1. Método de valoración del potencial antioxidante en alimentos, **caracterizado** porque se determina espectrofotométricamente la interacción entre una muestra problema y un sistema cromóforo constituido por ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) y su correspondiente radical.

2. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque se lleva a cabo adicionando dicha muestra problema sobre una cantidad conocida de dicho sistema cromóforo, previamente formado enzimáticamente, en una disolución tamponada, y estimando las pérdidas de absorbancia a una determinada longitud de onda λ.

3. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque se emplea adicionalmente una sustancia patrón para construir una recta de calibrado que relaciona absorbancia y concentración de patrón, a partir de la cual se determina el valor del potencial antioxidante de dicha muestra problema como mg/mL de patrón que produce el mismo efecto antioxidante que dicha muestra problema.

4. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho sistema cromóforo se preforma a partir de peroxidasa, peróxido de hidrógeno y ABTS en una disolución acuosa tamponada.

5. Método según la reivindicación 1 y 4, **caracterizado** porque el pH del medio acuoso tamponado está comprendido entre 3,0 y 8,0.

6. Método según la reivindicación 5, **caracterizado** porque el pH es de 4,5.

7. Método según la reivindicación 2, **caracterizado** porque las mediciones de absorbancia se efectúan a una longitud de onda comprendida entre 400 y 700 nm.

8. Método según la reivindicación 7, **caracterizado** porque dicha longitud de onda es 414 nm.

9. Método según la reivindicación 7, **caracterizado** por que dicha longitud de onda es 700 nm.

10. Método según la reivindicación 3, **caracterizado** porque dicha sustancia patrón está seleccionada del grupo formado por ácido L-ascórbico, Trolox, un flavonoide, un ácido fenólico, resveratrol y sinigrina.

11. Método según la reivindicación 10, **caracterizado** porque dicha sustancia patrón es ácido L-ascórbico.

12. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicho método se lleva a cabo adicionando dicha muestra problema sobre una disolución de radical ABTS previamente formado, en un medio de reacción constituido por peróxido de hidrógeno, enzima peroxidasa, tampón glicina HCl 50 mM a pH 4, 5 y seguidamente se va determinando la absorbancia a 414 nm a lo largo del tiempo.

13. Método según las reivindicación 12 anterior, **caracterizado** porque se construye una recta de calibrado que relaciona absorbancia y concentración de ácido L-ascórbico a partir de la cual se determina el valor del potencial antioxidante de dicha muestra como mg/mL de ácido L-ascórbico que produce el mismo efecto antioxidante que dicha muestra problema.

14. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dicha muestra problema es un alimento sólido o líquido o una bebida apta para el consumo humano.

15. Método según la reivindicación 14, **caracterizado** porque dicha muestra problema es un zumo de fruta.

16. Método según la reivindicación 14, **caracterizado** porque dicha muestra problema es un zumo de hortalizas.

17. Método según la reivindicación 14, **caracterizado** porque dicha muestra problema es un vino.

18. Método según la reivindicación 14, **caracterizado** porque dicha muestra problema es una cerveza.

19. Método según la reivindicación 14, **caracterizado** porque dicha muestra problema es un refresco.

20. Método según la reivindicación 14, **caracterizado** porque dicha muestra problema es una infusión.

21. Método según la reivindicación 14, **caracterizado** porque dicha muestra problema es una bebida isotópica.

22. Método según la reivindicación 14, **caracterizado** porque dicha muestra problema es un extracto vegetal.

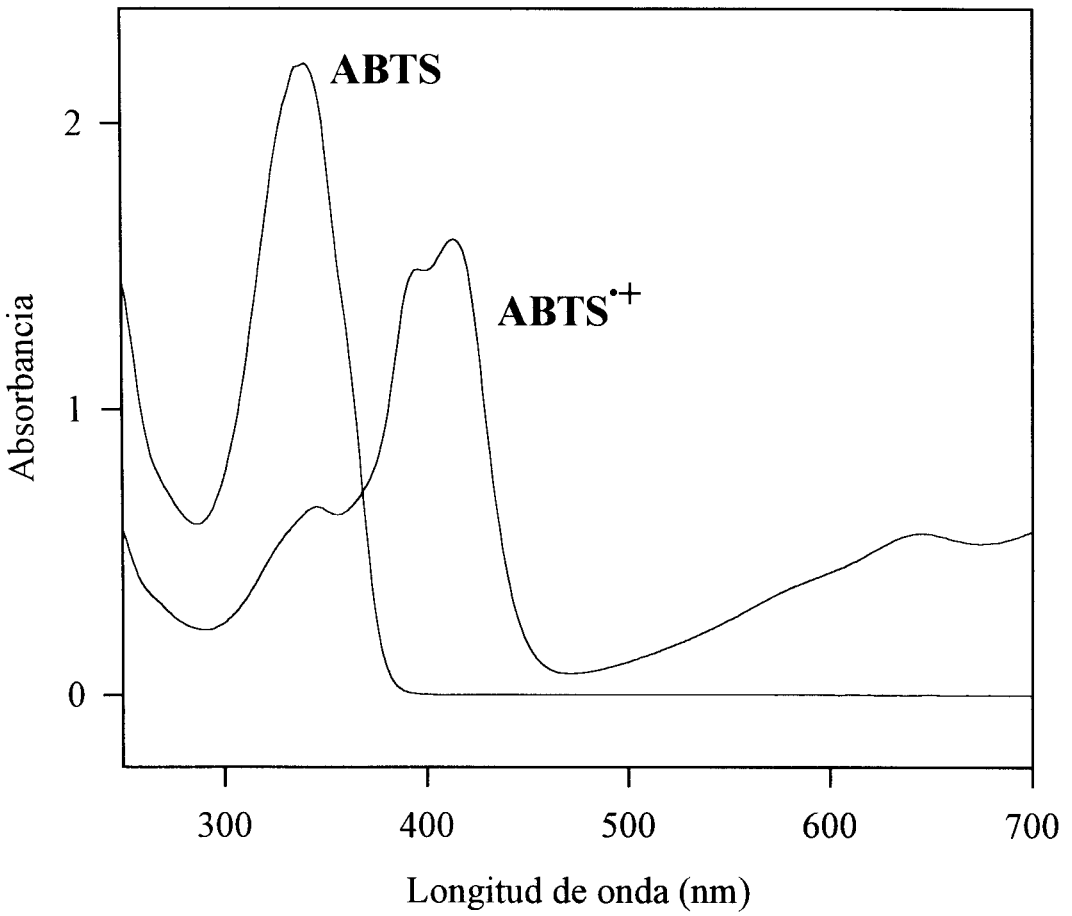
ABTS
ABTS•+
Absorbancia
2
1
0
300
400
500
600
700
Longitud de onda (nm)

Figura 1

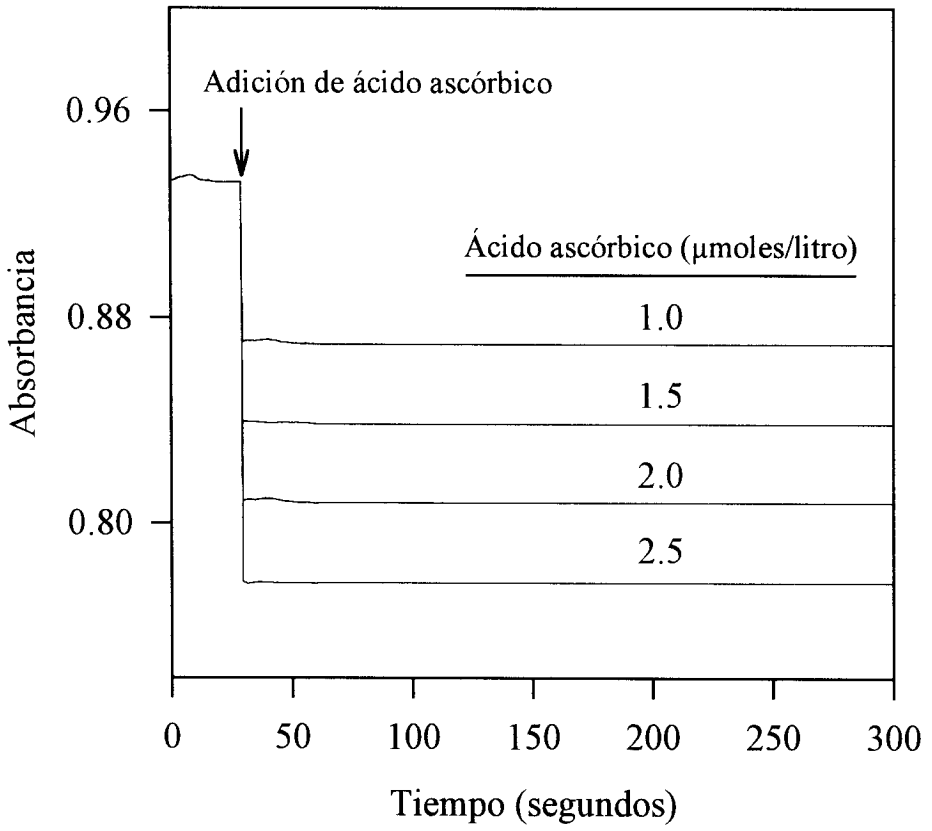
Adición de ácido ascórbico
Ácido ascórbico (µmoles/litro)
1.0
1.5
2.0
2.5
Absorbancia
0.96
0.88
0.80
0
50
100
150
200
250
300
Tiempo (segundos)

Figura 2

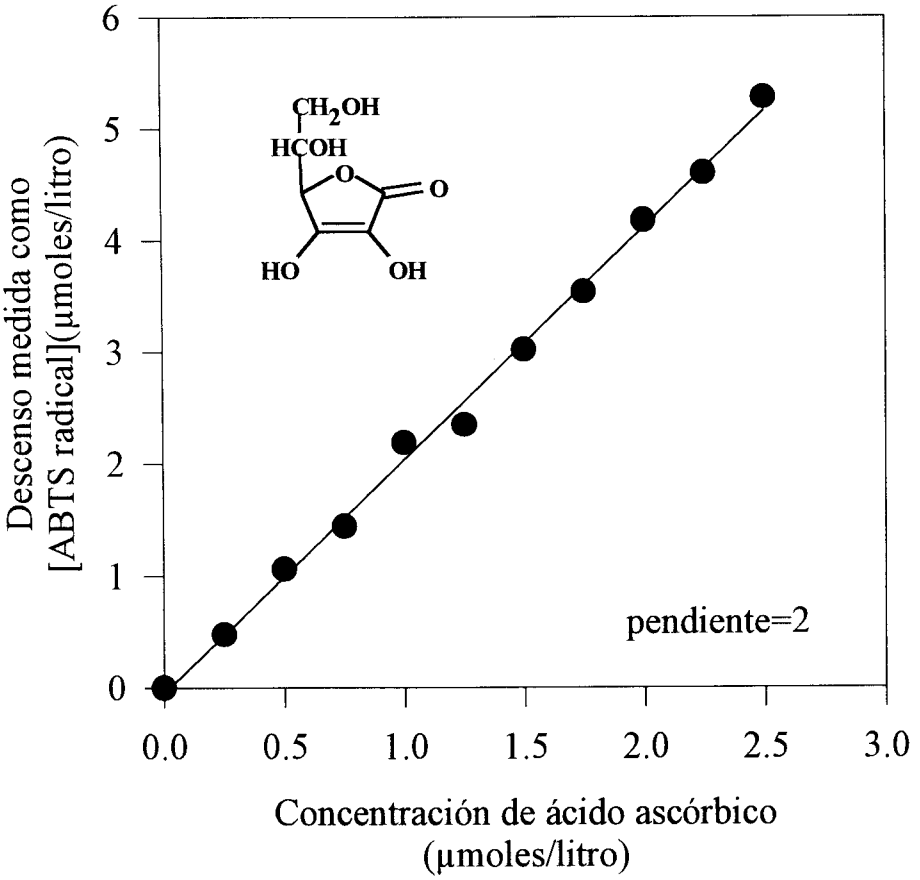
Descenso medida como
[ABTS radical](µmoles/litro)
6
5
4
3
2
1
0
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
3.0
Concentración de ácido ascórbico
(µmoles/litro)
pendiente=2
CH2OH
HCOH
O
O
HO
OH

Figura 3

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) ES 2 151 401

(21) N.° solicitud: 009801290

(22) Fecha de presentación de la solicitud: **19.06.1998**

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl.**[7]**:** C12Q 1/28

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ARNAO, M.B. et al.: "Inhibition by L-ascorbic acid and other antioxidants of the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) oxidation catalyzed by peroxidase: a new approach for determining total antioxidant status of foods", Analytical Biochemistry, (1996), Vol. 236 n° 2, páginas 255-261. ISSN: 0003-2697, todo el documento.	1-8,10-22
X	RICE-EVANS, C. et al.: "Total antioxidant status in plasma and body fluids", Methods in Enzymol., (1994), Vol. 234, páginas 279-293, todo el documento.	1-5,10
X	MILLER, N.J. et al.: "A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates", Clin. Sci., (1993), Vol. 84, páginas 407-412, todo el documento.	1-5,10
X	WO 9210759 A1 (BRITISH TECHNOLOGY GROUP LTD.) 25.06.1992, reivindicaciones 10-12.	1-5

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

[×] para todas las reivindicaciones

[ ] para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
27.10.2000	A. Maquedano Herrero	1/1