



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 301 436**

⑫ Número de solicitud: 200702946

⑬ Int. Cl.:
A23L 1/305 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **31.08.2005**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2008**

Fecha de la concesión: **22.04.2009**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **08.05.2009**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
08.05.2009

⑲ Número de la solicitud inicial: **200502161**

⑳ Titular/es: **Universidad de Málaga**
c/ Severo Ochoa, 4 (P.T.A.)
29590 Campanillas, Málaga, ES

㉑ Inventor/es: **Coba Luque, Francisca de la;**
Aguilera Arjona, José y
López Figueroa, Félix

㉒ Agente: **No consta**

㉓ Título: **Uso de aminoácido tipo micosporina (porfira 334) como antioxidante o aditivo en productos alimentarios.**

㉔ Resumen:

Uso de aminoácido tipo micosporina (porfira 334) como antioxidante o aditivo en productos alimentarios. La presente invención se encuadra en el sector biotecnológico y describe el potencial uso de un aminoácido tipo micosporina (MAA), concretamente de porfira 334 aislado del alga roja *Porphyra leucostica*, como antioxidante o aditivo en la preparación de productos de la industria alimentaria tales como preparados nutracéuticos o alimentos funcionales.

ES 2 301 436 B1

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

DESCRIPCIÓN

Uso de aminoácido tipo micosporina (porfira 334) como antioxidante o aditivo en productos alimentarios.

5 Sector de la técnica

La presente invención se encuadra en el sector biotecnológico y describe el potencial uso de un aminoácido tipo micosporina (MAA), concretamente de porfira 334 aislado del alga roja *Porphyra leucostica*, como antioxidante o aditivo en la preparación de productos de la industria alimentaria tales como preparados nutraceuticos o alimentos funcionales.

Estado de la técnica

La radiación ultravioleta es uno de factores biológicos que limitan la supervivencia, fisiología y crecimiento de muchos organismos. Algunos de los múltiples efectos dañinos de la radiación UV incluye la alteración de moléculas de ADN y proteínas, inactivación de enzimas y a la formación de radicales libres, los cuales atacan a membranas celulares y otras moléculas diana alterando su funcionalidad. Todos los organismos aerobios disponen de una gran variedad de sistemas de defensa antioxidante tanto enzimáticos como no enzimáticos que se coordinan cooperativamente y protegen al organismo de los riesgos que conlleva el estrés oxidativo. Entre ellos destacan las actividades enzimáticas de la superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX) y catalasa (CAT); además del ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), glutatión (GSH), β -caroteno, vitamina A, flavonoides y ácidos fenólicos entre otros.

Se entiende por radical libre a cualquier especie química que contiene uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos de manera que un compuesto puede convertirse en radical libre captando o perdiendo un electrón. Aunque existen radicales libres de muy distinta naturaleza, son las especies que derivan de la molécula de oxígeno (ROS) las más abundantes en los organismos aerobios destacando productos de la ruptura o la excitación del O_2 como el oxígeno singlete 1O_2 y especies de oxígeno que están parcialmente reducidas como el radical hidroxilo ($OH\bullet$), aniones superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estas moléculas inestables recorren el organismo tomando electrones con lo que recuperan su estabilidad electroquímica, esto las hace muy peligrosas porque para conseguirlo atacan moléculas estables. Una vez que el radical libre ha conseguido tomar el electrón que necesita para emparejar su electrón libre, la otra molécula se convierte a su vez en un radical libre, iniciándose así un ciclo destructivo para nuestras células.

Los radicales libres dan lugar a alteraciones importantes en moléculas como ADN, lípidos y proteínas, alterando gravemente el ciclo y la funcionalidad celular. El ADN puede sufrir pérdida de bases así como la ruptura de una o de ambas hebras del material genético, alteraciones que pueden traducirse en mutaciones irreversibles. Muchas proteínas son capaces de absorber una gran cantidad de oxidaciones sin que aparentemente se vea afectada su función. Sin embargo, es indudable que las consecuencias de las alteraciones en algunas funciones, por ejemplo, la recepción y transmisión de señales, el transporte de iones, la duplicación y reparación del ADN, las respuestas a condiciones de tensión y el metabolismo energético, la transcripción y traducción pueden ser críticas para la célula. Los daños producidos por el $OH\bullet$ y el 1O_2 son irreversibles y en términos generales marcan las proteínas para su degradación. Las membranas celulares también pueden resultar seriamente dañadas en situación de estrés oxidativo ya que fosfolípidos que tienen ácidos grasos con varios dobles enlaces son muy susceptibles a la oxidación por pérdida de un hidrógeno (alílico). Una vez generado el radical carbono en un ácido graso, éste reacciona con el oxígeno molecular formando un radical peroxilo. El radical peroxilo puede tomar un hidrógeno alílico a otro metileno con lo cual se propaga la reacción. Los hidroperóxidos, que son compuestos estables, si entran en contacto con iones metálicos de transición producirán más radicales libres que iniciarán y propagarán otras reacciones en cadena. Así, las membranas resultan seriamente dañadas y por tanto su funcionalidad se ve alterada.

Los radicales libres se asocian con un amplio rango de patologías y enfermedades como el Alzheimer o el Parkinson y afecciones relacionadas con la exposición solar como la aparición de cataratas, fotoenvejecimiento, episodios inflamatorios y neoplasias. También son los responsables de la oxidación de las grasas de los alimentos, que es la forma de deterioro más importante después de las alteraciones producidas por microorganismos. Con la oxidación, aparecen olores y sabores a rancio, se altera el color y la textura, y desciende el valor nutritivo al perderse algunas vitaminas y ácidos grasos poliinsaturados. Además, los productos formados en la oxidación pueden llegar a ser nocivos para la salud.

Los aminoácidos tipo micosporina están constituidos por un anillo de ciclohexenona o de ciclohexenimina, conjugado con un sustituyente nitrogenado de un aminoácido o su aminoalcohol que actúa como cromóforo permitiendo la absorción de determinada radiación de onda corta. Los metabolitos que se aíslan en hongos presentan un rango de absorción entre 310 y 320 nm y poseen anillos de ciclohexenona exclusivamente, conociéndoseles por el nombre de *micosporinas* en referencia a su origen. Por el contrario, los metabolitos que se aíslan de organismos marinos y algas contienen anillos de ciclohexenimina, con absorciones máximas entre 310 y 360 nm y se les conoce con el nombre de *aminoácidos tipo micosporina* ó *MAAs*. Aún así, la mycosporine-glycine y la mycosporine taurine son aminociclohexenonas aisladas de organismos marinos. En la actualidad hay descritas 13 micosporinas distintas en hongos y 23 MAAs en organismos marinos. Son moléculas pequeñas, con pesos moleculares que rondan los 330 Da y presentan una alta fotoestabilidad. Se comportan como moléculas anfóteras, similares a los aminoácidos, de manera que presen-

tan cargas positivas y negativas en la misma molécula. Muestran características físico-químicas propias de compuestos iónicos por ejemplo alto punto de ebullición y alta solubilidad en agua.

Son muchas las funciones que se les ha atribuido a estas moléculas en el organismo: desde osmolito orgánico en comunidades cianobacterianas *Chlorogloeopsis*, pigmentos accesorios fotosintéticos o precursores de estos, a moléculas determinantes en procesos reproductivos de algunas especies de peces, sin embargo es el papel fotoprotector frente a la radiación UV el más aceptado y documentado ya que al parecer actúan protegiendo parcialmente a los componentes celulares y procesos fisiológicos. Un número de trabajos han evaluado este tipo de moléculas por sus actividad como fotoprotectores de uso tópico vehiculizando extractos naturales con un alto porcentaje de MAAs y viendo su FPS y su potencial fotoprotector en células vegetales, queratinocitos humanos, etc. (Patente US 6787147; Patente WO 02/39974; Patente WO 03/020236). También se han publicado trabajos que hacen referencia a las propiedades antioxidativas de extractos obtenidos de algas y corales.

Dunlap y Yamamoto en 1995 (Comp. Biochem. Physiol. 112: 105-114) apuntaron a una posible actividad antioxidante de mycosporine-glycine mediante ensayos *in vitro* de peroxidación lipídica (método de la fosfatidilcolina) a partir de extractos de organismos marinos que contenían MAAs, mientras que otras iminoMAAs como porphyra 334, shinorine, palythine, asterine 330 y palythanol se mostraban oxidativamente robustas y no participaban en reacciones de oxidación-reducción. No obstante, como se ha indicado, dichos ensayos fueron realizados con extractos algales que contenían además de MAAs un alto porcentaje de otros componentes celulares como polisacáridos, enzimas, etc., por lo que no es posible afirmar firmemente la actividad antioxidante de mycosporine-glycine (o M-gly) en base a dicho trabajo.

Nakayama y colaboradores en 1999 (J. Am. Oil Chem. Soc., 76: 649-653) aislaron un nuevo aminoácido tipo micosporina del alga roja *Porphyra yezoensis* llamado usujilene, ya identificado en *Palmaria palmata* pero no en ninguna especie de *Porphyra*. Sus resultados indicaban que tal MAA mostraba actividad antioxidante frente a la autooxidación del ácido linoleico (Métodos del ácido tiobarbitúrico y tiocianato férrico), donando determinados hidrógenos a radicales lipídicos LOO $\cdot$ y dando lugar a moléculas de MAAs estabilizadas por resonancia al igual que el α -tocoferol.

Suh y colaboradores en 2003 (Photochem. Photobiol. 78: 109-113) sugieren también la función antioxidante de la M-gly, pero probablemente actuando junto con otros MAAs activos. La M-gly, entre otros, podría jugar un importante papel participando en la eliminación de O $_2$ $^{\cdot -}$ generado por sistemas fotosintetizadores endógenos.

Yakovleva y colaboradores en 2004 (Comp. Biochem. Physiol., 139: 721-739) examinaron la importancia de la M-gly como antioxidante funcional frente a estrés térmico en dos corales, *Platygyra ryukyuensis* y *Stylophora pistillata*, en base a la correlación entre el grado de susceptibilidad y la concentración endógena de M-gly.

También la patente US2004228875 hace referencia a las propiedades antioxidativas de extractos obtenidos a partir de algas del género *Porphyra*, aunque sin concluir sobre el posible papel jugado por MAAs.

Publicaciones más recientes analizan las propiedades antioxidativas de extractos obtenidos a partir de algas pero sin concretar la participación de MAAs (Yuan y colaboradores, 2005, Food Chem. Toxicol., 43: 1073-1081; Kuda y colaboradores, 2005, J. Food Compos. Anal., 18: 625-633).

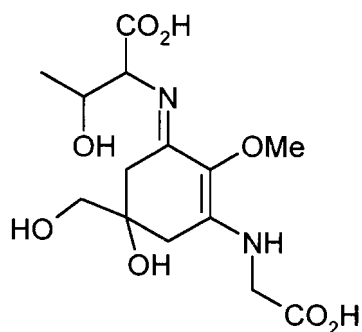
Se puede concluir, por tanto, que el papel antioxidante de los iminoMAAs como tales, es decir, purificados o aislados en un alto grado de pureza, no se conoce bien, como tampoco su comportamiento a nivel de secuestro de radicales libres hidrosolubles.

Un antioxidante se define como una sustancia que en bajas concentraciones comparado con un sustrato oxidable, retrasa o previene su oxidación. La presente invención describe la potencialidad del MAA porphyra 334 aislado de *Porphyra leucosticta* como secuestrador de radicales e inhibidor de la peroxidación lipídica. En los ensayos realizados, el nuevo antioxidante es comparado con otro antioxidante ya conocido, el α -tocoferol. El compuesto descrito podría utilizarse en aplicaciones terapéuticas, y en aplicaciones no médicas para la estabilización de compuestos susceptibles del deterioro oxidativo, en la preservación de alimentos o productos relacionados, y en complementos nutricionales, nutracéuticos, alimentos funcionales o de parafarmacia por sus propiedades antioxidantes para prevenir el estrés oxidativo.

Los MAAs se encuentran de manera natural en los organismos aislados en orden de mg/gPS, destacando porphyra 334 que se encuentra en el alga *Porphyra leucosticta* en orden de 3 - 6 mg/gPS. Como sabemos las algas marinas se han utilizado como alimento humano desde la antigüedad, especialmente en los países orientales y cuya cultura se encuentra en expansión en todo el mundo. *Porphyra* (cuyo nombre vulgar en Japón es nori) es una de las algas marinas más importantes utilizadas como alimento humano. En los últimos años *Porphyra* ha figurado en las estadísticas japonesas sobre pesca como la tercera captura en orden de importancia y tiene un contenido elevado de valiosas proteínas comestibles de manera que este estudio podría dar un valor añadido a determinados tipo de alimentos naturales.

Descripción detallada de la invención

La presente invención presenta un compuesto aislado de *Porphyra leucosticta* con la siguiente estructura y de utilidad como antioxidante y secuestrador de radicales libres.



Porphyrin 334

Se han purificado compuestos del tipo aminoácidos tipo micosporina en fase acuosa partiendo de *Porphyra leucosticta*. Los compuestos se han detectado y caracterizado por HPLC. Se empleó un detector UV-visible (detector de fotodiodos 996), que medía la absorbancia para cada muestra entre los 290 y 400 nm. Una vez extraído el cromatograma a 330 nm, se identificaron los picos por co-cromatografía según sus espectros y tiempos de retención, comparándose con estándares de MAAs.

La extracción a escala preparativa se realizó disolviendo 60-80 g (PF) de material biológico en 1 litro de metanol al 20% v/v e incubándose en un baño termostático a 45°C durante 2 horas. Posteriormente se centrifuga el extracto a 14000 rpm durante 15 min y rotavaporación a 45°C para eliminar parte del metanol de la muestra.

La purificación se realizó en tres pasos consecutivos en los que se combinan técnicas cromatográficas de absorción mediante la aplicación de carbono activo, precipitación de polisacáridos al añadir a la muestra metanol 100% y separación final mediante cromatografía de intercambio iónico. Finalmente se obtuvieron soluciones acuosas de MAA en alto grado de pureza en concentraciones del orden de mM.

Capacidad antioxidante de los aminoácidos tipo micosporina

Para medir la actividad como secuestrador de radicales hidrosolubles se ha utilizado el método de la ABTS peroxidasa, el cual permite determinar la actividad antioxidante total (TAA) de una muestra entendida como un parámetro que permite cuantificar la capacidad de una muestra, natural o procesada, de secuestrar radicales libres presentes en una solución acuosa.

Porphyrin 334 aislado de *Porphyra leucosticta* no presenta actividad antioxidante significativa a ningún pH ensayado como inhibidor de la producción de radicales libres hidrosolubles (ABTS⁺).

Capacidad como inhibidor de la peroxidación lipídica

Porphyrin 334 aislado de *Porphyra leucosticta* se estudió como inhibidor de la peroxidación lipídica *in vitro* mediante la técnica de decoloración del β -caroteno. El método de decoloración del β -caroteno es ampliamente utilizado para la determinación de la capacidad antioxidante de diversas sustancias en medio lipofílico, la mayoría de ellas extraídas de frutas, vegetales y demás productos destinados a consumo alimentario para poder determinar su mayor o menor grado de autoconservación en estado natural. En este ensayo, como control positivo se utilizó el α -tocoferol (α -TOC).

Porphyrin 334 aislado de *Porphyra leucosticta* muestra actividad antioxidante moderada a nivel de inhibición de la peroxidación lipídica. Se constituye, pues, como un antioxidante de actividad moderada *in vitro*.

Secuestro de radicales superóxido

El protocolo que se llevó a cabo fue basado en Marklund & Marklund (1974, Eur. j. Biochem., 47: 469-474) con algunas modificaciones. Relaciones de dosis-respuesta para las MAAs objeto de estudio se determinaron a diferentes concentraciones.

Porphyrin 334 aislado de *Porphyra leucosticta* a concentraciones de 1 mM inhibe al 50% la cinética de oxidación del piragalol.

Al actuar como antioxidante y secuestrador de radicales libres, este compuesto, en extractos o preparados que lo contengan, podría utilizarse en preparados o formulaciones farmacéuticas para la prevención y el tratamiento terapéutico de enfermedades o afecciones relacionadas con los radicales libres, en productos de parafarmacia, en alimentos funcionales, complementos nutricionales y preparados nutracéuticos, y en la industria alimentaria como potencial antioxidante (aditivo).

Descripción de los dibujos

Figura 1. Área (%) de picos eluidos y concentraciones expresadas en mg g^{-1} PS de diferentes MAAs presentes en extractos metanólicos de las algas *Porphyra leucosticta*, *Gymnogongrus devoniensis*, *Gelidium sesquipedale* y del líquen *Lichina pygmaea*. Se observa la presencia de un tipo de MAA mayoritario en cada organismo (> 66%) junto con otras MAAs minoritarias y trazas de sustancias no identificadas.

Figura 2. Cromatogramas de extractos acuosos de MAAs eluidos de la columna cargada con resina DOWEX.

Figura 3. Tabla. Dosis (μM) - respuesta de la actividad antioxidante (%) de porphyra 334 aislado de *Porphyra leucosticta* con respecto a $10 \mu\text{M}$ de α -tocoferol por el método de decoloración del β -caroteno. Los valores representan los valores medios y desviación estándar de 3 experimentos. Porphyra 334 aislado de *Porphyra leucosticta* resulta un buen antioxidante a concentración de $100\text{--}200 \mu\text{M}$.

Figura 4. Capacidad de secuestro de radicales superóxido generados por el método del pirogalol de porphyra 334 aislado de *Porphyra leucosticta*. Se representa la media y desviación estándar de tres experimentos.

Modos de realización de la invención

Purificación a escala preparativa de porphyra 334 a partir del alga roja Porphyra leucosticta

Se ha purificado compuestos del tipo aminoácidos tipo micosporina en fase acuosa partiendo de *Porphyra leucosticta*. Los compuestos se han detectado y caracterizado por HPLC (Waters 600). La columna empleada para la separación de los MAAs en el HPLC fue una C_8 (Sphereclone™, Phenomenex, Aschaffenburg, Alemania), empaquetada con micropartículas porosas de sílica de 5 mm de diámetro con superficie derivatizada con una cadena alifática de 8 átomos de carbono (octadecil silano). Su tamaño era de $250 \times 4.6 \text{ mm}$. Se empleó una precolumna (Phenomenex, Aschaffenburg, Alemania) afín a la columna empleada. La fase móvil que se empleó fue metanol al 2.5% (v/v, calidad HPLC) más 0.1% de ácido acético (v/v) bombeada isocráticamente a una velocidad de flujo de 0.5 ml min^{-1} . Se empleó un detector UV-visible (detector de fotodiodos 996), que medía la absorbancia para cada muestra entre los 290 y 400 nm. En la figura 1 vienen recogidos los porcentajes en área de los picos cromatografiados de distintos extractos algales, algunos identificados como MAAs y otros desconocidos. El objetivo de la purificación fue aislar en fase acuosa el MAA mayoritario en *Porphyra leucosticta* además de eliminar trazas y otros tipos de compuestos no identificados.

Una vez extraído el cromatograma a 330 nm, se identificaron los picos por co-cromatografía según sus espectros y tiempos de retención, comparándose con estándares de MAAs, proporcionados por el profesor Dr. Ulf Karsten (Universidad de Rostock, Alemania) extraídos de distintos organismos marinos: *Mastocarpus stellatus* (shinorine), *Porphyra yezoensis* (porphyra-334), *Bostrychia scorpioides* (palythine), los ojos de la trucha del coral *Plectropomus leopardus* (asterine 330) y el líquen *Lichina pygmaea* recolectado en Francia (M-glycine). Los cromatogramas de los extractos recogidos después del paso por la columna de intercambio iónico DOWEX50 se muestran en la figura 2. Como se puede observar, en el caso del extracto procedente del alga *P. leucosticta*, inicialmente con la presencia de 4 MAAs distintas, posteriormente sólo aparecen dos de ellos, porphyra 334 y shinorine, tan semejantes en cuanto a estructura, grupos funcionales y tamaño que su separación resultó realmente difícil. La proporción entre shinorine y porphyra 334 se mantuvo constante a lo largo del proceso de purificación (1: 8.5 aprox.).

La extracción a escala preparativa se realizó disolviendo 60-80 g (PF) de material biológico en 1 litro de metanol al 20% v/v e incubándose en un baño termostático a 45°C durante 2 horas. Posteriormente se centrifuga el extracto a 14000 rpm durante 15 min y rotavaporación a 45°C para eliminar parte del metanol de la muestra.

La purificación se realiza en tres pasos consecutivos en los que se combinan técnicas cromatográficas de absorción mediante la aplicación de carbono activo, precipitación de polisacáridos al añadir a la muestra metanol 100% y separación final mediante cromatografía de intercambio iónico (resina Dowex 50 W x 8-100). Para la elución del aminoácido tipo micosporina porphyra 334 se utilizó como eluyente agua bidestilada, con un pH ligeramente alcalino (7.2). Finalmente se obtuvieron soluciones acuosas de MAA en alto grado de pureza en concentraciones del orden de mM.

Capacidad antioxidante a nivel de secuestro de radicales hidrosolubles ABTS

Para medir la actividad como secuestradores de radicales hidrosolubles se ha utilizado el método de la ABTS peroxidasa, el cual permite determinar la actividad antioxidante total (TAA) de una muestra entendida como un parámetro

ES 2 301 436 B1

que permite cuantificar la capacidad de una muestra, natural o procesada, de secuestrar radicales libres presentes en una solución acuosa. Este parámetro está orientado a dar información de la actividad antioxidante que puede presentar una muestra concreta con independencia de las actividades parciales que puedan presentar cada uno de sus componentes o los efectos de sinergismo que pudiesen establecerse.

El 2,2'-Azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfónico) o ABTS es un compuesto que presenta gran estabilidad química, alta solubilidad en agua y un máximo de absorción en la banda del UVA a 342 nm. Este compuesto en presencia de H_2O_2 y enzimas peroxidasas deriva a un radical metaestable (ABTS⁺) con un espectro de absorción característico y diferente al ABTS, presentando máximos de absorción en la región espectral del UV y visible a 413, 645, 727 y 811 nm.

El ABTS es un producto que presenta gran estabilidad en un amplio rango de pH, mostrando el mismo espectro de absorbancia a pH 4 y pH 8.5. Así mismo, la formación del radical ABTS⁺ también se lleva a cabo en ese rango de pH pero la actividad enzimática de la peroxidasa sí que es dependiente del pH del medio de reacción de manera que al alcalinizarse ésta la actividad disminuye, aumentando así el periodo de retardo o "lag time". La actividad de nuestra enzima se podría ajustar a una curva exponencial de manera que es máxima a pH 4.5 y deja de ser activa a pH superiores a 10. Nuestros ensayos discurrirán a pH 6-8.5 de manera que aseguramos la actividad de la enzima.

La cuantificación de la capacidad de secuestro de radicales libres de una muestra se llevan a cabo mediante ensayos de decoloración en los cuales la formación de ABTS⁺ da lugar a una coloración característica que disminuirá de manera proporcional a la cantidad de sustancias con capacidad de atrapar estos radicales que se le añadan al volumen de reacción. Esta pérdida de color puede medirse mediante seguimientos cinéticos de pérdida de absorbancia a 413 nm (longitud de onda que no interfiere con otras moléculas) a lo largo de un minuto utilizando como peroxidasa la HRP y como control negativo el ácido ascórbico (L-ASC). El medio de reacción se compone de tampón fosfato 50 mM pH 6, 7.5, 8, H_2O_2 2 mM, ABTS 2 mM, enzima HRP 0.25 μ M y muestra a concentraciones crecientes.

El cálculo de TAA se establece según la relación entre las pendientes (Abs/min) de ensayos enzimáticos en los cuales el curso de la reacción es estimado en ausencia de antioxidantes (control positivo), y en presencia de diferentes concentraciones de sustancias con posible actividad antioxidante. De este modo, la pendiente de la cinética control correspondería a una TAA del cero por ciento, calculándose en base a ésta los porcentajes de inhibición de las demás curvas.

Capacidad como inhibidor de la peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica es un mecanismo bien establecido de daño celular en plantas y animales, así como de deterioro de alimentos (enranciamiento). Este proceso conduce a la producción de peróxidos lipídicos y aldehídos de degradación que conlleva pérdida de la función de la membrana celular y de su integridad. Porphyr 334 aislado de *Porphyra leucosticta* se estudió como inhibidor de la peroxidación lipídica *in vitro* mediante la técnica de decoloración del β -caroteno.

El método de decoloración del β -caroteno es ampliamente utilizado para la determinación de la capacidad antioxidante de diversas sustancias en medio lipofílico, la mayoría de ellas extraídas de frutas, vegetales y demás productos destinados a consumo alimentario para poder determinar su mayor o menor grado de autoconservación en estado natural. Se trata de un método espectrofotométrico que mide la inhibición que causa un antioxidante sobre la decoloración del β -caroteno en un sistema acuoso emulsificado con Tween 20 y ácido linoleico.

El ácido linoleico se autooxida a una alta velocidad ante la presencia de átomos de hidrógeno especialmente activados. El β -caroteno, precursor de la vitamina A, también es conocido como antioxidante lipofílico que previene de la peroxidación lipídica en membranas secuestrando moléculas de oxígeno singlete y radicales lipídicos peróxilos. El β -caroteno, cuando se encuentra en presencia de ácido linoleico, cede electrones retardando la etapa de iniciación del proceso de autooxidación del ácido linoleico así como limitando la fase de propagación del daño al eliminar simultáneamente radicales peróxidos formados. Si añadimos una nueva sustancia con posible capacidad antioxidante al medio de reacción que contiene ácido linoleico y β -caroteno, ésta nueva sustancia tenderá a oxidarse ella preferentemente al β -caroteno, compitiendo con este por el secuestro de estos radicales.

El β -caroteno presenta un máximo de absorción a 470 nm. Este máximo varía cuando la molécula se oxida ya que pierde dobles enlaces y la estructura del cromóforo de la molécula se ve alterada, perdiendo así su característico color naranja y pudiendo ser detectado espectrofotométricamente. La absorbancia del medio de reacción permanecerá invariable a lo largo del tiempo en presencia de sustancias antioxidantes, advirtiéndose una caída en la absorbancia de la muestra cuando se mida en ausencia de antioxidantes. Así pues, la medida de la capacidad antioxidante de una sustancia será inversamente proporcional a la caída de pendiente de la curva que describe la oxidación del β -caroteno (medida a longitud de onda de 470 nm).

En este ensayo, como control positivo se utilizó el α -tocoferol (α -TOC).

ES 2 301 436 B1

La actividad de la solución se evaluó según el grado de decoloración del β -caroteno, aplicando la fórmula propuesta por Hidalgo y colaboradores (1994, *Phytochemistry*, 37: 1585-1587) con algunas modificaciones:

$$AA = [P \text{ muestra} - P \text{ control} / P \text{ Patrón} - P \text{ control}] \cdot 100$$

P hace referencia a las pendientes de las curvas de decoloración obtenidas (Abs/tiempo). Para ello ajustamos mediante regresión lineal la parte de la curva cinética que describe un comportamiento lineal. Los coeficientes de correlación para cada réplica de cada muestra eran todos superiores a 0.98.

Secuestro de radicales superóxido

Los radicales superóxidos (O_2^-) son mediadores de reacciones de autooxidación de algunos compuestos. La mayoría de las veces estos compuestos oxidados se caracterizan por poseer un espectro de absorción característico y cuantificable por espectrofotometría.

El pirogalol (1,2,3-benzenotriol) es una sustancia que se autooxida rápidamente en presencia de oxígeno especialmente en soluciones alcalinas. A pH 7.9 la SOD inhibe el 99% de la reacción indicando una participación prácticamente total del anión superóxido O_2^- en la reacción. El pirogalol oxidado presenta un máximo de absorción a 420 nm de manera que la capacidad de las MAAs para secuestrar radicales superóxido fue medida como pérdida de absorbancia de ensayos cinéticos monitorizados espectrofotométricamente (Shimadzu UV 1603) durante un minuto de reacción. El protocolo que se llevó a cabo fue basado en Marklund & Marklund (1974, *Eur. J. Biochem.*, 47: 469-474) con algunas modificaciones. La mezcla reacción contenía 0.4 mM de pirogalol y el MAA a diferentes concentraciones en 50 mM de tampón fosfato a pH 8.2, conteniendo 1 mM de ácido dietilenotriaminopentaacético en un volumen final de incubación de 1 ml. La temperatura se mantuvo estable a $20 \pm 1^\circ\text{C}$. El control positivo fue la curva cinética de generación de radicales de pirogalol oxidado en ausencia de antioxidantes para compararlos con distintas concentraciones de SOD como antioxidante conocido. Relaciones de dosis-respuesta para las MAAs objeto de estudio se determinaron a diferentes concentraciones. La capacidad de secuestro de radicales superóxido de los extractos purificados se evaluó siguiendo la siguiente fórmula:

$$AA = 100 - [P \text{ muestra} \cdot 100 / P \text{ control}]$$

P hace referencia a las pendientes de las curvas cinéticas de oxidación del pirogalol (Abs/tiempo).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso del extracto de aminoácido tipo micosporina *porphyra 334* extraído del alga roja *Porphyra leucosticta* como potencial antioxidante o aditivo en la preparación de productos en la industria alimentaria tales como preparados nutracéuticos o alimentos funcionales.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1.

	Área (%)	mg MAA g ⁻¹ PS
<u>Porphyra leucosticta</u>		
Porphyra 334	66 ± 0.9	3.33 ± 0.38
Shinorine	7.76 ± 0.02	0.38 ± 0.08
Asterine 330	5.28 ± 0.3	0.14 ± 0.01
Palythine	5.66 ± 0.06	0.17 ± 0.02
Otros compuestos que absorben en el UV	15.3 ± 0.8	-
<u>Lichyna pigmaea</u>		
Mycosporine-glycine	72.85 ± 0.44	1.11 ± 0.23
Otros compuestos que absorben en el UV	27.14 ± 0.44	-
<u>Gymnogongrus devoniensis</u>		
Shinorine	98.3 ± 0.4	0.55 ± 0.07
Otros compuestos que absorben en el UV	1.7 ± 0.35	-
<u>Gelidium sesquipedale</u>		
Shinorine	10.97 ± 0.97	0.1 ± 0.02
Asterine 330	67.78 ± 0.64	0.47 ± 0.03
Palythine	21.23 ± 0.32	0.13 ± 0.01

Figura 2.

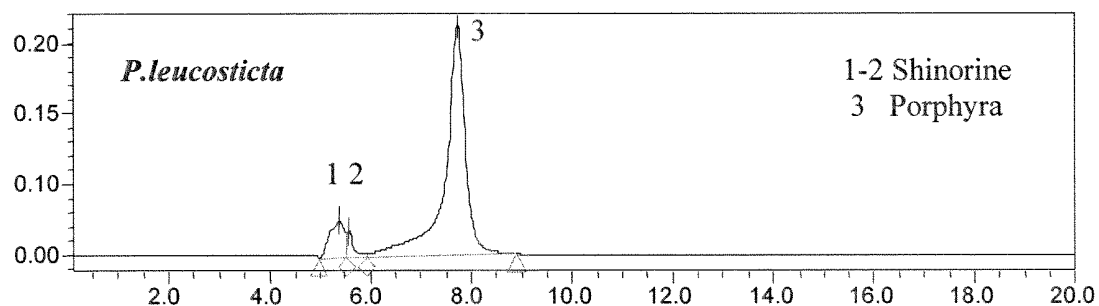


Figura 3.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE (%) COMPARADA CON α -TOC 10 μ M				
MAA	10	50	100	200
Porphyra 334	11.22 $\pm$ 6.38	37.9 $\pm$ 9.47	61.89 $\pm$ 8.41	70.39 $\pm$ 5.9

Figura 4.

INHIBICIÓN (%)					
MAAs	Concentración extracto puro (μ M)				
	50	100	200	500	1000
Porphyra 334	-	-	16.15 $\pm$ 3.15	32.44 $\pm$ 2.77	46.08 $\pm$ 4.71

Compuesto de referencia Superóxido dismutasa (11.7 U/ml) 90.25 $\pm$ 3.7%



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 301 436

⑫ Nº de solicitud: 200702946

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 31.08.2005

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: A23L 1/305 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 03041679 A2 (LARENA) 22.05.2003, ejemplos 1-4.	1
Y	FR 2655268 A1 (S.E.C.M.A.) 07.06.1991, reivindicaciones 1-6.	1
Y	GRÖNIGER et al. Photoprotective compounds in cyanobacteria, phytoplankton and macroalgae- a database. Journal of Phytochemistry and Photobiology B. Biology, 2000, vol. 58, páginas 115-122.	1
A	MASON et al. Ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids (MAAs) are acquired from their diet by medaka fish (Oryzias latipes) but not by SKH-1 hairless mice. Comparative Biochemistry and Physiology Part A, 1998, vol. 120, páginas 587-598.	1

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

13.05.2008

Examinador

A. Polo Díez

Página

1/1