



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 363 585**

② Número de solicitud: 201000098

⑤ Int. Cl.:
G01N 27/26 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **28.01.2010**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **09.08.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
09.08.2011

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Alcalá
Plaza de San Diego, s/n
28801 Alcalá de Henares, Madrid, ES**

⑦ Inventor/es: **Sánchez-Hernández, Laura;
García-Ruiz, Carmen;
Crego Navazo, Antonio Luis y
Marina Alegre, María Luisa**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Procedimiento para la detección de adulteraciones en aceites de oliva con aceites de semilla (soja y girasol) basado en la determinación de trigonellina por Electroforesis Capilar.**

⑤ Resumen:

Procedimiento para la detección de adulteraciones en aceites de oliva con aceites de semilla (soja y girasol) basado en la determinación de trigonellina por Electroforesis Capilar.

El objetivo de la invención es el desarrollo de un procedimiento analítico por Electroforesis Capilar con detección UV que permita determinar el aminoácido no proteico trigonellina en semillas (girasol y soja) y en sus aceites e investigar su presencia en aceitunas y aceites de oliva. La presencia de este aminoácido en las semillas de girasol y soja y en sus aceites permite establecer una relación de trazabilidad aceite-semilla. La ausencia de trigonellina en aceituna (Picual, Hojiblanca y Arbequina) y sus aceites permite proponer este aminoácido como marcador novedoso para la detección de adulteraciones de aceites de oliva virgen con aceites de semilla (girasol y soja).

La invención consiste en la separación electroforética de trigonellina del resto de componentes de las muestras utilizando un medio ácido como el tampón formiato amónico a pH 2.0 y una detección UV directa a 195 nm.

ES 2 363 585 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la detección de adulteraciones en aceites de oliva con aceites de semilla (soja y girasol) basado en la determinación de trigonellina por Electroforesis Capilar.

El procedimiento analítico propuesto permite la identificación y la cuantificación de trigonellina en semillas (girasol y soja) y sus aceites empleando la técnica de Electroforesis Capilar (CZE) con detección UV. Este procedimiento también permite establecer la ausencia de trigonellina en aceituna (Picual, Hojiblanca y Arbequina) y aceites de oliva virgen (Picual, Hojiblanca y Arbequina). Teniendo en cuenta que la mezcla de aceites de oliva con aceites de semillas no está permitida por la legislación vigente, este procedimiento supone un gran avance por la posibilidad de emplear un solo compuesto, trigonellina, como marcador de posibles adulteraciones de aceite de oliva con aceites de semillas (girasol y soja) con el fin de evaluar la calidad de los aceites de oliva, así como para evitar fraudes económicos. Asimismo, permite evaluar la seguridad por la potencial presencia de algunos alérgenos en otros aceites vegetales (p. ej. soja).

Estado de la técnica

El aceite de oliva es conocido, valorado y producido principalmente en la cuenca Mediterránea desde tiempos remotos y se extrae de los frutos de aceitunas que crecen en los olivos *Olea europea L.* [1]. Hoy en día, en el mercado se pueden distinguir numerosos tipos de aceites de oliva: *aceites de oliva virgen* que se clasifican según su grado de acidez y se obtienen mediante un tratamiento físico (prensado o centrifugación) que permite separar el aceite de la aceituna triturada, *aceites refinados* (de oliva o de orujo) que se obtienen mediante un proceso químico (extracción con disolventes) y el *aceite de oliva* que se obtiene al mezclar aceite de oliva virgen con aceite de oliva refinado [2, 3]. El aceite de oliva más apreciado y de mayor precio en el mercado es el aceite de oliva virgen extra.

La importancia de los aceites de oliva, y en particular el aceite de oliva virgen extra, se ha puesto de manifiesto en numerosas publicaciones, donde el consumo de este producto se ha relacionado con beneficios para la salud humana. Así, se ha publicado que el aceite de oliva contribuye a reducir el colesterol en plasma [4, 5] y tiene propiedades antioxidantes [1] además de otros beneficios más generales [6]. También se ha investigado su acción protectora frente al cáncer de mama [7-10], al carcinoma colorectal [11] o a enfermedades cardiovasculares [12, 13].

Debido a que el aceite de oliva virgen extra es uno de los aceites más caros de origen vegetal, ha sido objeto de adulteraciones para incrementar los beneficios económicos de los fabricantes. El método más común de adulteración consiste en añadir al aceite de oliva aceites más baratos. Entre ellos, los más comunes son los aceites de girasol o soja. Además, la adulteración del aceite de oliva con aceites de semilla afecta la seguridad alimentaria porque existen aceites de materias primas, como p. ej. la soja, que tienen un conocido potencial alergénico y pueden afectar a la salud del consumidor si se añade fraudulentamente. De hecho, en la normativa vigente se prohíbe concretamente la mezcla de aceite de oliva con los de semillas o con cualquier otro aceite o grasa [14]. Por ello, es necesario desarrollar aproximaciones analíticas que permitan determinar la posible adulteración de los aceites de oliva con aceites de semillas.

El aceite de oliva tiene una composición compleja porque contiene numerosos constituyentes de diversa naturaleza. A grandes rasgos, la composición del aceite de oliva virgen se puede dividir en dos fracciones: (i) una fracción saponificable que forma la mayor parte del aceite, entre el 98.5 y el 99.5%, compuesta por triglicéridos, ácidos grasos, ceras y fosfolípidos y (ii) una fracción no saponificable que solo representa entre el 0.5 y el 1.5% del aceite. Esta última fracción está compuesta por hidrocarburos, tocoferoles, alcoholes grasos, esteroides, compuestos fenólicos, pigmentos y compuestos volátiles y aromáticos. La autenticidad de los aceites de oliva se ha estudiado mediante técnicas cromatográficas determinando ácidos grasos, triglicéridos, esteroides, tocoferoles y tocotrienoles [15]. Por otro lado, estudios recientes confirman que, entre los componentes minoritarios del aceite, existen péptidos y proteínas que se transfieren de las semillas o frutos al aceite [16, 17]. Además, hay un trabajo donde se estudian perfiles de aminoácidos proteicos para clasificar aceites vegetales según su origen botánico utilizando espectrometría de masas [18]. Sin embargo, aunque se ha confirmado la presencia de aminoácidos no proteicos libres en diversas semillas alimenticias [19-21], no existen antecedentes que estudien la presencia de éstos en los aceites obtenidos de estas semillas.

La trigonellina es un aminoácido no proteico con un grupo amino cuaternario que le proporciona una carga positiva permanente. La trigonellina también es una betaína. Las betaínas son osmorreguladores naturales de muchas plantas y están presentes en un gran número de alimentos. Además, las betaínas han sido objeto de estudio en varias investigaciones por sus efectos biológicos potencialmente positivos en humanos. La trigonellina se ha determinado en un amplio número de alimentos como frutas, cereales, verduras, bebidas, carne, marisco y productos lácteos mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) tras su derivatización con sulfonato de 2-naftilo trifluorometano [22, 23]. En la gran mayoría de ellos, la trigonellina se encontró en concentraciones muy bajas (p.ej. chocolate) o no detectables (p.ej. aceite de oliva), para un límite de detección de 1 $\mu\text{g/g}$, mientras que se encontraron concentraciones elevadas de trigonellina en granos de café, lentejas y garbanzos. Esto ha sido corroborado en otros artículos donde el contenido de trigonellina en la planta de lentejas fue determinado mediante HPLC tras su derivatización

ES 2 363 585 A1

con fenilisotiocianato (PITC) [20, 24], En granos de café, donde se encuentra el mayor contenido en trigonellina, se ha determinado mediante HPLC [25-31], HPLC acoplada a Espectrometría de Masas (MS) [32], Cromatografía de Gases (GC) [33], GC-MS [34] y MS [35]. La trigonellina también se ha encontrado en cantidades considerables en semillas de soja tras su determinación espectrofotométrica en un espectrómetro UV [36] o mediante HPLC tras su derivatización con PITC [37].

El objetivo de esta invención es el desarrollo de un procedimiento por CE con detección UV que permita estudiar trigonellina, en semillas (girasol y soja), frutos (aceitunas) y sus respectivos aceites, con el fin de proponer por primera vez este compuesto como marcador de adulteraciones de aceite de oliva con aceites de semillas.

Descripción de la invención

El procedimiento para la determinación de trigonellina por CE se basa en un medio de separación ácido realizado en un equipo de electroforesis capilar HP^{3D}CE equipado con un detector ultravioleta-visible (UV-Vis) de diodos en serie (DAD).

TABLA 1

Resumen del procedimiento de determinación de trigonellina por CE

Tampón de separación	Formiato amónico 0.1 M a pH 2.0
Capilar	Sílice fundida: 50 µm de diámetro interno, 375 µm de diámetro externo y 75 cm de longitud total (66.5 cm de longitud efectiva)
Acondicionamiento	Tampón de separación (1 bar, 2 min)
Inyección de muestra	50 mbar - 15 s (muestras de semilla) 50 mbar - 50 s (frutos de aceituna y muestras de aceites)
Temperatura	35 °C
Voltaje	25 kV
Detección	UV a 195 ± 2.5 nm

Determinación cuantitativa de trigonellina en semillas de girasol y soja y sus aceites

El procedimiento se aplica a la cuantificación de trigonellina en semillas de soja, semillas de girasol, aceite de girasol y aceites de soja. Los resultados confirman la presencia de trigonellina tanto en las semillas de soja y girasol como en sus respectivos aceites. De esta forma se establece la trazabilidad de trigonellina desde la semilla hasta su aceite. En la Figura 1 se muestra el electroferograma correspondiente a las semillas de soja y girasol mientras que en la Figura 2 se muestran los perfiles electroforéticos obtenidos para los aceites de semillas estudiados (girasol refinado, soja refinado y virgen). Se observa que el pico de trigonellina se encuentra separado del resto de componentes de la matriz por lo que el método es selectivo a la hora de identificar y cuantificar el analito de interés. Para la identificación de trigonellina se obtienen los espectros UV de los picos y se comparan con el espectro UV de trigonellina patrón. También se enriquece la muestra con una disolución patrón de concentración conocida para observar el aumento del pico asignado a trigonellina según su espectro UV.

Para la determinación de trigonellina se inyectan las muestras sin enriquecer y enriquecidas con cuatro niveles de calibrado, se realiza una recta de calibrado representando las áreas corregidas (A_c) del pico de trigonellina en función de la concentración añadida y conocida de ésta. Esta recta se extrapola hasta cortar el eje de ordenadas ($y = 0$) para determinar la concentración de trigonellina en la disolución inyectada y se consideran las diluciones realizadas para conocer la concentración de trigonellina en la muestra analizada. La Tabla 2 muestra las concentraciones obtenidas para las semillas (girasol y soja) y los aceites de estas semillas. Las semillas de girasol presentan mayor contenido en trigonellina que las semillas de soja, al igual que sus correspondientes aceites refinados. El aceite de soja virgen tiene más concentración de trigonellina que el aceite refinado, hecho que puede deberse a que en el proceso de refinamiento el aceite se extrae con disolventes orgánicos poco selectivos con compuestos iónicos como la trigonellina.

ES 2 363 585 A1

TABLA 2

Cantidades determinadas de trigonellina para las semillas y aceites analizados

5

10

15

20

Muestra analizada^a	Concentración de trigonellina
Semilla de girasol	13.2 µg/g
Semilla de soja	8.2 µg/g
Aceite de girasol refinado	0.021 µg/g
Aceite de soja refinado	0.010 µg/g
Aceite virgen de soja	0.036 µg/g

25

^a Residuo obtenido a partir de la reconstitución de la muestra extraída en acetonitrilo:agua (40:60, v/v) y diluida 1/20 para girasol, 1/5 para soja y 1/2 para aceites antes de su cuantificación. Las diluciones se establecen para evitar distorsiones en la forma de pico de la trigonellina durante el enriquecimiento debido a la alta concentración en trigonellina en la muestra real.

30

Análisis de aceitunas y aceites de oliva virgen. Propuesta de trigonellina como marcador de adulteraciones de aceites de oliva con aceites de semillas (girasol y soja)

35

40

Se estudian aceitunas de tres variedades (Picual, Hojiblanca y Arbequina) y aceites de oliva virgen extra de las mismas tres variedades de aceituna. Al analizar estas muestras por el procedimiento inventado, no se detecta trigonellina. En la Figura 3 se muestra el perfil electroforético obtenido para una muestra de aceituna (variedad Picual) y los perfiles obtenidos para las tres variedades de aceites de oliva virgen extra (Picual, Hojiblanca y Arbequina). Como la trigonellina no se detecta en los aceites de oliva virgen extra ni tampoco en la aceituna, que en caso de estar presente estaría en mayor concentración, se propone esta betaína como marcador novedoso de adulteraciones de aceites de oliva con aceites de semillas (girasol y soja). De hecho, como el límite de detección es de 1 ng/g (referido a 0.3 mL de disolución y 40 g de muestra) y la mínima cantidad de trigonellina detectada en aceites es de 10 ng/g (aceite de soja refinado), en el caso más desfavorable el procedimiento permitirá detectar adiciones de aceite de soja a aceite de oliva virgen de tan solo el 10% del aceite de oliva analizado.

45

Ventajas principales del procedimiento

50

Las ventajas principales del procedimiento inventado son las siguientes:

55

- El procedimiento objeto de la invención es sencillo porque utiliza una separación electroforética en medio ácido y detección UV sin necesidad de llevar a cabo un paso previo de derivatización.
- El procedimiento desarrollado permite identificar la trigonellina a través de su espectro UV y a través del enriquecimiento con un patrón.
- El procedimiento desarrollado permite separar el pico de trigonellina del resto de picos de la matriz analizada en unos 15 min.
- El procedimiento desarrollado permite determinar el contenido de trigonellina en las semillas de soja y girasol y sus respectivos aceites permitiendo establecer relaciones de trazabilidad aceite-semilla al estar presente la trigonellina en ambos tipos de muestra.
- El procedimiento desarrollado pone de manifiesto la ausencia de trigonellina en aceituna (Picual, Hojiblanca y Arbequina) y en aceite de oliva virgen extra de estas tres variedades de aceituna, siendo una herramienta valiosa para los laboratorios de control de calidad porque la trigonellina puede emplearse como nuevo marcador de adulteraciones de aceites de oliva virgen con aceites de semilla (girasol y soja).

65

Descripción de las figuras

Figura 1. Perfil electroforético obtenido para semillas de girasol (A) y soja (B). Los espectros UV de los principales picos también se muestran. Condiciones experimentales: BGE, 0.1 M formiato amónico pH = 2.0; capilar de sílice fundida, 75 cm (66.5 cm a la ventana de detección) x 50 μ m ID; temperatura, 35°C; voltaje, 25 kV; inyección por presión a 50 mbar x 15 s. Muestras disueltas en acetonitrilo:agua (40:60, v/v). El asterisco señala la posición del pico de trigonellina.

Figura 2. Perfil electroforético obtenido para aceites de girasol y soja diluidos 1/2 sin enriquecer y muestras enriquecidas con 0.025 mM de trigonellina patrón: (A) aceite de soja virgen; (B) aceite de soja refinado; y (C) aceite de girasol refinado. Condiciones experimentales: inyección por presión a 50 mbar x 50 s y demás condiciones experimentales como en la Figura 1. El asterisco señala la posición del pico de trigonellina. El espectro UV de los picos de trigonellina también se muestra.

Figura 3. (A) Perfil electroforético obtenido para una muestra de aceituna (variedad Picual) diluida 1/10 en acetonitrilo/agua (40:60, v/v), sin enriquecer y enriquecida con 0.025 mM de trigonellina patrón; y (B) perfil electroforético obtenido para tres variedades de aceites de oliva virgen extra a) Picual, b) Hojiblanca, c) Arbequina, y d) Hojiblanca enriquecida con 0.05 mM de trigonellina patrón. Condiciones experimentales de la Figura 2. El asterisco señala la posición del pico de trigonellina no detectado.

Modo de realización

Preparación de patrones y muestras

La preparación de las disoluciones patrón se realiza a partir de una disolución inicial de trigonellina 10 mM en acetonitrilo/agua (40/60) que se diluye hasta la concentración requerida.

Se emplean distintos tratamientos de muestra dependiendo de la complejidad de la muestra analizada: (i) las semillas de girasol, las semillas de soja y las aceitunas se someten a una extracción sólido-líquido con disolventes. Se muelen, se homogenizan y se pesan (10 g). Se extraen con 40 mL de metanol/cloroformo (67:33, v/v), se agita vigorosamente y se deja una noche a -20°C antes de centrifugar a 11000 g durante 15 min. El sobrenadante se recoge y el residuo se lava con 25 mL de metanol/cloroformo/agua (53:26:21, v/v/v). El sobrenadante obtenido se combina con el recogido previamente y se añaden 10 mL de cloroformo y 10 mL de agua y se centrifuga. La fase acuosa se recoge y se lleva a evaporar hasta sequedad. El residuo obtenido se reconstituye en 300 μ L de acetonitrilo/agua (40:60, v/v). (ii) Los aceites vegetales y aceites de oliva virgen extra se someten a una extracción líquido-líquido. Se pesan 40 g y se mezclan con 160 mL de metanol/cloroformo (67:33, v/v), se agita vigorosamente y se deja una noche a -20°C antes de centrifugar a 4000 g durante 15 min. La fase acuosa se recoge y la fase orgánica (abajo) se lava con 100 mL de metanol/cloroformo/agua (53:26:21, v/v/v) recogiendo el sobrenadante y añadiéndolo con la fase acuosa previamente obtenida. A esta fase se añaden 100 mL de agua y 40 mL de cloroformo, se centrifuga y se recoge la fase acuosa que se lleva a evaporar hasta sequedad. El residuo obtenido se reconstituye en 300 μ L de acetonitrilo/agua (40/60).

Los extractos de las muestras se congelan hasta su análisis. Antes de su inyección en el sistema de CE se descongelan y se centrifugan en un eppendorf durante 2 min.

Características analíticas del procedimiento

Las características analíticas evaluadas para el procedimiento objeto de la invención son la linealidad, los límites de detección y de cuantificación y la precisión (instrumental e intermedia).

La *linealidad* se comprueba en el intervalo de concentraciones de trabajo de 0.025-1 mM de trigonellina inyectada por triplicado tanto para 15 s como para 50 s de inyección.

Los *límites de detección* se determinan inyectando 15 s o 50 s de una disolución de trigonellina patrón y calculando una relación señal/ruido de 3. Los valores obtenidos son 3.3 μ M (0.46 mg/L) y 0.9 μ M (0.13 mg/L), respectivamente. Para los *límites de cuantificación* se considera una relación señal/ruido de 10 y se obtienen valores de 8.3 μ M (1.15 mg/L) y 3.0 μ M (0.42 mg/L) para las inyecciones de 15 s y 50 s, respectivamente.

La precisión se expresa como la desviación estándar relativa en % (RSD), de los tiempos de migración y de las áreas corregidas ($A_c = A_i/t_i$ donde A_i corresponde al área de pico y t_i al tiempo de migración del pico), resultantes de inyectar una disolución de trigonellina patrón 0.25 mM durante 15 s o 50 s, respectivamente. Los valores de precisión se evalúan en términos de repetibilidad instrumental y precisión intermedia (ver tabla 3).

ES 2 363 585 A1

TABLA 3

Precisión del procedimiento desarrollado para la determinación de trigonellina por CE

Tiempo de inyección hidrodinámica a 50 mbar	15 s	50 s
Repetibilidad instrumental (RSD, %) (n = 6)^a		
Tiempo de migración	1.5	3.3
Área corregida	2.3	2.4
Precisión intermedia (RSD, %) (n = 9)^b		
Tiempo de migración	1.8	2.3
Área corregida	1.2	2.5

^a Calculada a partir de seis inyecciones consecutivas en el mismo día de una disolución de trigonellina patrón (0.25 mM).

^b Determinada a partir de tres disoluciones patrón independientes (0.25 mM) inyectadas en triplicado en tres días consecutivos.

El procedimiento inventado es aplicable a la cuantificación de trigonellina en semillas de girasol y soja y sus respectivos aceites. La cuantificación se lleva a cabo utilizando el método de adiciones patrón, que consiste en añadir concentraciones conocidas de trigonellina (0.25, 0.50, 0.75 y 1 mM) a la muestra y calcular por extrapolación la cantidad de trigonellina en las muestras. Este método de cuantificación se emplea porque se comprueba, mediante comparación de las pendientes obtenidas por el método del patrón externo y adiciones patrón, la existencia de efectos de matriz, es decir, que la señal analítica para trigonellina se ve afectada por los demás componentes de la muestra.

Aplicación industrial

Tanto a los fabricantes como a la Administración les interesa que existan procedimientos analíticos rápidos y simples que permitan el control de calidad y seguridad de los aceites de oliva virgen extra, que son productos producidos principalmente por España a nivel mundial. El novedoso empleo de trigonellina como marcador de adulteraciones de aceites de oliva con aceites de semilla (girasol y soja) permite realizar un control de calidad del aceite de oliva de forma rápida y sencilla.

Bibliografía

[1] Owen, R. W.; Giacosa, A.; Hull, W. E.; Haubner, R.; Wurtele, G.; Spiegelhalter B.; Bartsch H. *The Lancet Oncology* 2000, 1, 107-112.

[2] Chiavaro, E.; Rodriguez-Estrada, M. T.; Barnaba, C.; Vittadini, E.; Cerretani, L.; Bendini, A. *Anal. Chim. Acta* 2008, 625, 215-226.

[3] Vaclavik, L.; Cajka, T.; Hrbek, V.; Hajslova, J. *Anal. Chim. Acta* 2009, 645, 56-63.

[4] Bruckner, G., *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications*. Chow, C. K.; Editorial: Marcel Denker, New York, 2000, 843-863.

[5] Ostlund, R. E. *Ann. Rev. Nutr.* 2002, 22, 533-549.

[6] Covas, M. I.; Ruiz-Gutierrez, V.; de la Torre, R.; Kafatos, A.; Lamuela-Raventos, R. M.; Osada, J.; Owen R. W.; Visioli F. *Nutr. Rev.* 2006, 64, S20-30.

[7] Martin-Moreno, J. M.; Willett, W. C.; Gorgojo, L.; Banegas, J. R.; Rodriguez-Artalejo, F.; Fernandez-Rodríguez, J. C.; Maisonneuve, P.; Boyle P. *Int. J. Cancer* 1994, 58, 774-80.

ES 2 363 585 A1

- [8] **Trichopoulou, A., Katsouyanni, K., Stuver, S., Tzala, L., Gnardellis, C., Rimm, E., Trichopoulos, D. J.** *Natl. Cancer Inst.* 1995, *87*, 110-16.
- [9] **La Vecchia, C.; Negri, E.; Franceschi, S.; Decarli, A.; Giacosa, A.; Lipworth, L.;** *Cancer Causes Control* 1995, *6*, 545-50.
- [10] **Simonsen, N. R.; Navajas, J. F-C.; Martín-Moreno, J. M.; Strain, J. J.; Huttunen, J. K.; Martín, B. C.; Thamn, M.; Kardinnal, A. F.; Van't Veer, P.; Kok, F. J.; Kohlmeier, L.** *Am. J. Clin. Nutr.* 1998, *68*, 134-141.
- [11] **Braga, C.; La Vecchia, C.; Francheschi, S.; Negri, E.; Parpinel, M.; Decarli, A.; Giacosa, A.; Trichopoulos, D.** *Cancer* 1998, *82*, 448-453.
- [12] **Parikh, P.; McDaniel, M. C.; Ashen, M. D.; Miller, J. I.; Sorrentino, M.; Chan, V., Blumenthal, R. S.; Sperling, L. S.** *J. Am. Coll. Cardiol.* 2005, *45*, 1379-1387.
- [13] **De Lorgeril, M.; Salen, P.; Martin, J. L.; Monjaud, I.; Delaye, J.; Mamelle, N.** *Circulation* 1999, *99*, 779-785.
- [14] Real Decreto 308/1983, de 25 de enero, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria de Aceites Vegetales Comestibles.
- [15] **Montealegre, C.; Marina Alegre, M. L.; García-Ruiz, C. J.** *Agric. Food Chem.* en prensa.
- [16] **Hidalgo, F. J.; Zamora, R.** *Trends Food Sci. Tech.*, 2006, *17*, 56-63.
- [17] **Martín-Hernández, C.; Bénet, S.; Obert, L.** *J. Agric. Food. Chem.* 2008, *56*, 4348-4351.
- [18] **Lerma-Garcia, M. J.; Ramis-Ramos, G.; Herrero-Martínez, J. M.; Simo-Alfonso E. F.** *Comm. Mass Spectrom.* 2007, *21*, 3751-3755.
- [19] **Rozan P.; Kuo, Y. H.; Lambein F.** *J. Agric. Food. Chem.* 2000, *48*, 716-723.
- [20] **Rozan P.; Kuo, Y. H.; Lambein F.** *Amino Acids* 2001, *20*, 319-324.
- [21] **Bell A. E.** *J. Agric. Food. Chem.* 2003, *51*, 2854-2865.
- [22] **de Zwart, F. J.; Slow, S.; Payne, R. J.; Lever, M.; George, P. M.; Gerrard, J. A.; Chambers, S. T.** *Food Chem.* 2003, *83*, 197-204.
- [23] **Slow, S.; Donaggio, M.; Cressey, P. J.; Lever, M.; George, P. M.; Chambers, S. T.** *J. Food Compos. Anal.* 2005, *18*, 473-485.
- [24] **Rozan, P.; Kuo, Y. H.; Lambein F.** *Phytochemistry* 2001, *58*, 281 -289.
- [25] **Van Duijn, J.; Van Der Stegen, G. H. D.** *J. Chromatogr.* 1979, *179*, 199-204.
- [26] **Stennert, A.; Maier, H. G. Z.** *Lebensm. Unters. Forsch.* 1994, *199*, 198-200.
- [27] **Ky, C. L.; Louarn, J.; Dussert, S.; Guyot, B.; Hamon, S.; Noiro, M.** *Food Chem.* 2001, *75*, 223-230.
- [28] **Minamisawa, M.; Yoshida, S.; Takai, N.** *Anal. Sci.* 2004, *20*, 325-328.
- [29] **Campa, C.; Ballester, I.; Doubeau, S., Dussert, S.; Hamon S.; Noiro, M.** *Food Chem.* 2004, *88*, 39-43.
- [30] **Farah, A.; Monteiro, M. C.; Calado, V.; Franca, A. S.; Trugo, L. C.** *Food Chem.* 2006, *98*, 373-380.
- [31] **Duarte G. S.; Pereira, A. A.; Farah, A.** *Food Chem.* 2010, *118*, 851-855.
- [32] **Perrone, D.; Marino Donangelo C.; Farah, A.** *Food Chem.* 2008, *110*, 1030-1035.
- [33] **De María, C. A. B.; Trugo, L. C.; Moreira, R. F. A.; Werneck, C. C.** *Food Chem.* 1994, *50*, 141-145.
- [34] **De María, C. A. B.; Trugo, L. C.; Aquino Neto, F. R.; Moreira, R. F. A.; Alviano, C. S.** *Food Chem.* 1996, *55*, 203-207.

ES 2 363 585 A1

[35] **Amorim, A. C. L.; Hovell, A. M. C.; Pinto, A. C.; Eberlin, M. N.; Arruda, N. P.; Pereira, E. J.; Bizzo H. R.; Catharino, R. R.; Morais Filho, Z. B.; Rezende, C. M. J.** *Braz. Chem. Soc.* 2009, *20*, 313-321.

[36] **Cho, Y.; Turnipseed, E. B.; Lightfoot, D. A.; Wood, A. J.** *Biol. Plantarum* 2008, *52*, 370-372.

[37] **Martínez-Villaluenga C.; Kuo Y. H.; Lambein F.; Frías J.; Vidal-Valverde, C.** *Eur. Food Res. Technol.* 2006, *224*, 177-186.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de determinación de trigonellina **caracterizado** porque permite estudiar este aminoácido no proteico en semillas (girasol y soja), frutos (aceituna) y sus aceites por Electroforesis Capilar (CE) con detección UV sin necesidad de derivatización y empleando un medio ácido.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque requiere diferente tratamiento de muestra, dependiendo de la muestra analizada: (i) extracción sólido-líquido para las semillas y frutos (aceituna) (10 g) y (ii) extracción líquido-líquido para los aceites (40 g). En ambos casos se extrae con metanolcloroformo (67:33, v/v), se agita vigorosamente y se deja una noche a -20°C. Después se centrifuga y el sobrenadante se recoge. El residuo se lava con metanol/cloroformo/agua (53:26:21, v/v/v) y se combina el nuevo sobrenadante con el recogido previamente. A este sobrenadante se le añade cloroformo y agua, se centrifuga y se recupera la fase acuosa que se lleva a evaporar hasta sequedad. El residuo se reconstituye en 300 μ L de acetonitrilo/agua (40:60, v/v).
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** por realizar la determinación de trigonellina mediante CE en un capilar de sílice fundida no recubierto de 50 μ m de diámetro interno y 375 μ m de diámetro externo con una longitud total de 75 cm que debe acondicionarse previamente a la inyección de los patrones y muestras con el tampón de separación (1 bar) durante 2 min.
- 20 4. Procedimiento según la reivindicación 3 **caracterizado** por el empleo de un medio de separación acuoso para CE con fórmico 0.1 M ajustado a pH 2.0 con hidróxido amónico al 25%.
- 25 5. Procedimiento según las reivindicaciones 3 y 4 **caracterizado** por los siguientes parámetros instrumentales en CE: inyección por presión de 50 mbar durante 15 s de las muestras de semillas (girasol y soja) y 50 mbar durante 50 s para las muestras de aceituna y los aceites de semilla (girasol y soja) y de oliva virgen extra; temperatura de 35°C y voltaje de separación de 25 kV.
- 30 6. Procedimiento según la reivindicación 5 **caracterizado** por el empleo de una estrategia de preconcentración (*stacking*) en el capilar para mejorar la sensibilidad y selectividad de detección en el caso de los aceites y aceituna.
- 35 7. Procedimiento según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la detección se realiza a 195 nm mediante un detector de diodos en serie (DAD).
8. Procedimiento según la reivindicación 7 **caracterizado** porque la identificación del pico de trigonellina en las muestras se realiza según su espectro UV, el cual presenta dos máximos de absorción **característicos** a 214 y 260 nm.
- 40 9. Procedimiento según las reivindicaciones 2, 5 y 8 **caracterizado** porque permite la identificación y determinación cuantitativa de trigonellina en semillas de girasol y soja y sus aceites.
10. Procedimiento según las reivindicaciones 2, 5 y 8 **caracterizado** porque establece la ausencia de trigonellina en aceitunas (Picual, Hojiblanca y Arbequina) y sus aceites.
- 45 11. Procedimiento según las reivindicaciones 9 y 10 **caracterizado** por la propuesta de trigonellina como marcador novedoso de adulteraciones de aceite de oliva con aceites de semillas (girasol y soja).

50

55

60

65

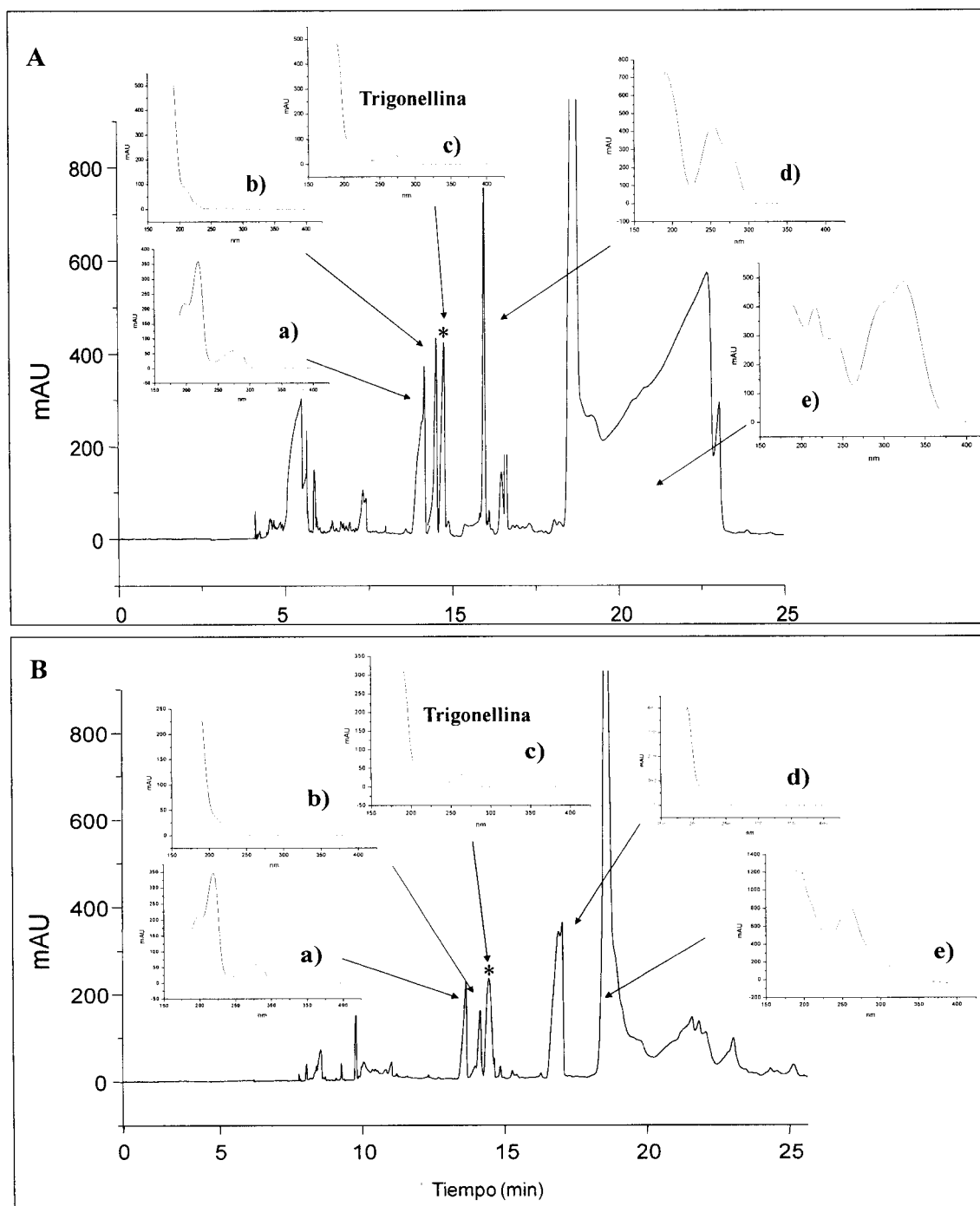


Figura 1

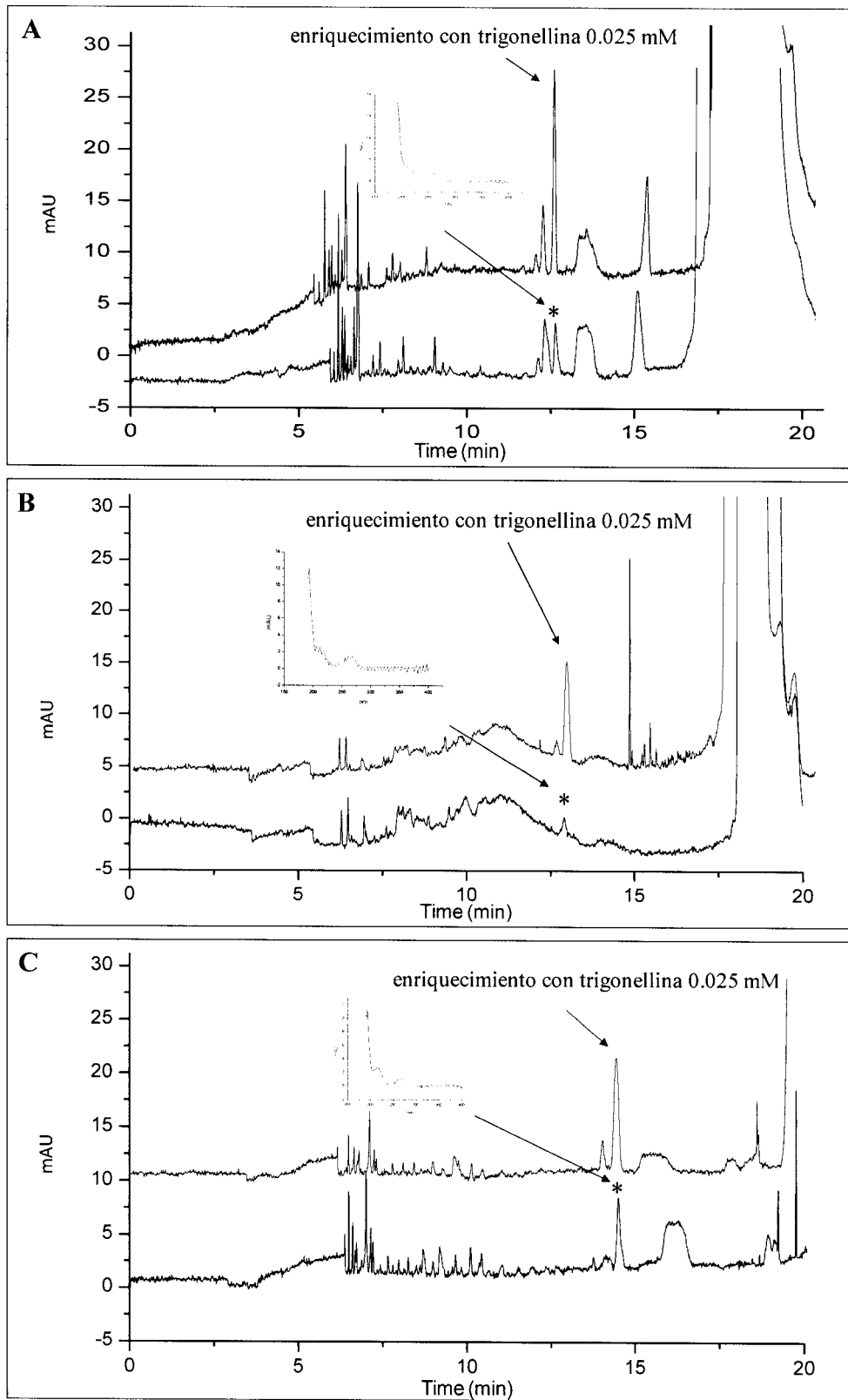


Figura 2

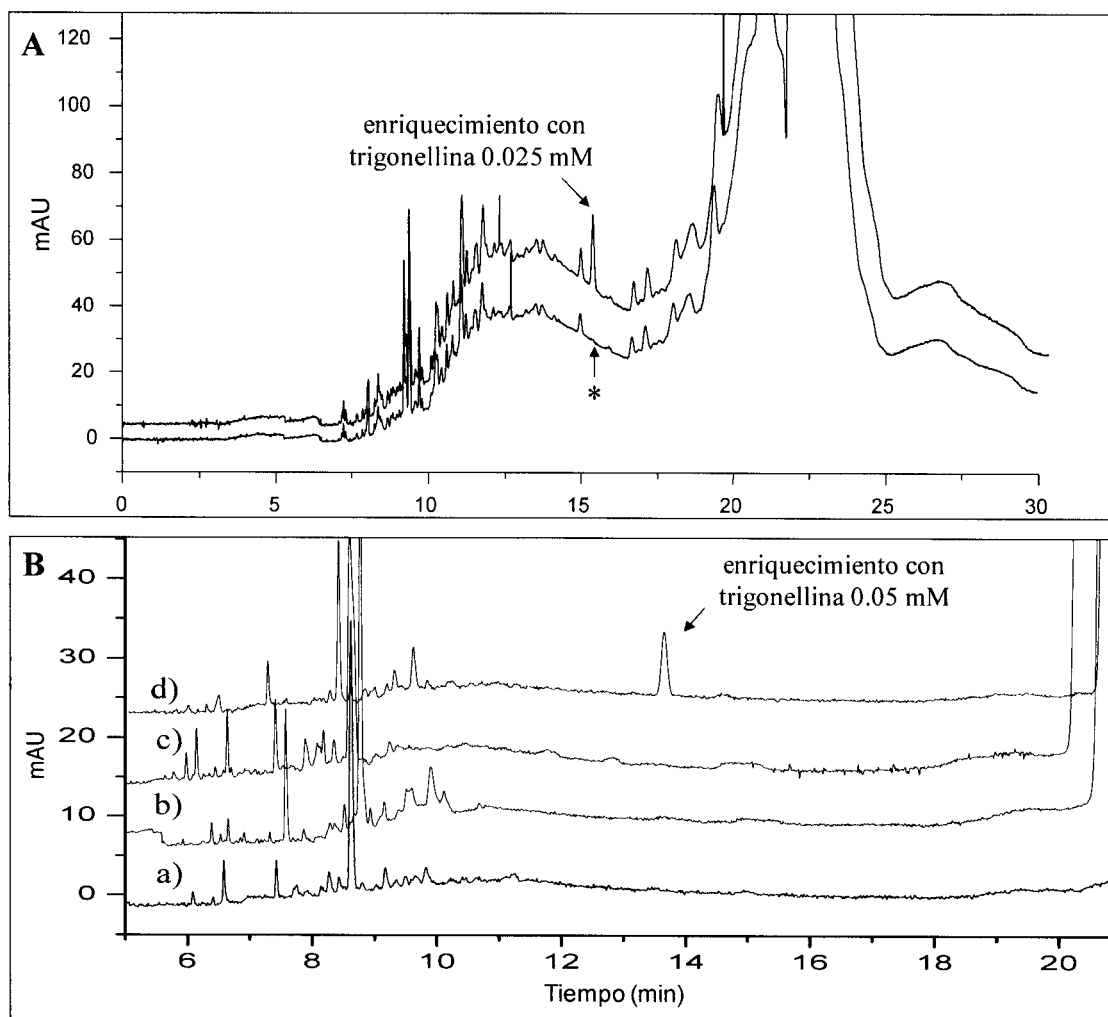


Figura 3



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 201000098

②² Fecha de presentación de la solicitud: 28.01.2010

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. Cl.: **G01N27/26** (01.01.2006)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ZHANG JINGHUA et al. Development of an analytical method for the determination of betaines in higher plants by capillary electrophoresis at low pH. <i>Phytochemical Analysis</i> 2002. Vol. 13 páginas 189-194. Página 189.	1-11
A	CASTRO-PUYANA, MARÍA et al. CE methods for the determination of non-protein amino acids in foods. <i>Electrophoresis</i> 2007. Vol. 28 páginas 4031-4045. Página 4034.	1-11
A	NISHIMURA, NAOKI et al. Application of capillary electrophoresis to the simultaneous determination of betaines in plants. <i>Analytical Sciences</i> 2001. Vol. 17 páginas 103-106.	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
10.03.2011

Examinador
I. Rueda Molíns

Página
1/4

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

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 10.03.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-11	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-11	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ZHANG JINGHUA et al. Development of an analytical method for the determination of betaines in higher plants by capillary electrophoresis at low pH. <i>Phytochemical Analysis</i> . Vol. 13 páginas 189-194.	2002
D02	CASTRO-PUYANA, MARÍA et al. CE methods for the determination of non-protein amino acids in foods. <i>Electrophoresis</i> . Vol. 28 páginas 4031-4045.	2007
D03	NISHIMURA, NAOKI et al. Application of capillary electrophoresis to the simultaneous determination of betaines in plants. <i>Analytical Sciences</i> . Vol. 17 páginas 103-106.	2001

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La solicitud de patente divulga un procedimiento para la detección de adulteraciones en aceites de oliva con aceites de semilla basado en la determinación de trigonellina por electroforesis capilar.

Los documentos D01, D02 y D03 muestran la determinación de aminoácidos no proteicos mediante electroforesis capilar.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Artículos 6 y 8 LP11/1986)

En las reivindicaciones 1-11 de la solicitud de patente se reivindica un procedimiento de determinación de trigonellina en semillas, frutos y sus aceites por electroforesis capilar con detección UV, sin necesidad de derivatización y empleando un medio ácido.

Los documentos D01 y D02, que son los que reflejan el estado de la técnica más cercano, muestran (en la página 189 el documento D01 y en la página 4034 el documento D02) un método para la determinación de trigonellina mediante electroforesis capilar con detección UV empleando un paso de derivatización. Por tanto, las reivindicaciones 1-11 presentan novedad y actividad inventiva según lo establecido en el Artículos 6 y 8 de la Ley 11/1986.