



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0621015-5 A2**

(22) Data de Depósito: 06/12/2006
(43) Data da Publicação: 29/11/2011
(RPI 2134)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 36/8962
A61K 36/00

(54) Título: COMPOSIÇÕES CONTENDO ALLIUM SATIVUM LINN. (ALHO) NATURALMENTE ENRIQUECIDAS COM COMPOSTOS ORGÂNICOS DE SELÊNIO PARA SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL

(30) Prioridade Unionista: 06/12/2005 US 11/164,787

(73) Titular(es): Sabinsa Corporation

(72) Inventor(es): Badmaev, Vladimir, Bammi, Rajinder, Kumar, Majeed, Muhammed, Nagabhushanam, Kalyanam, Prakash, Subbalakshmi

(74) Procurador(es): Guerra ADV.

(86) Pedido Internacional: PCT US2006046519 de 06/12/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/067600de 14/06/2007

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES CONTENDO ALLIUM SATIVUM LINN. (ALHO) NATURALMENTE ENRIQUECIDAS COM COMPOSTOS ORGÂNICOS DE SELÊNIO PARA SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL. A invenção divulga composições de alho enriquecidas com selênio que são um meio seguro e eficaz de oferecer quantidades suplementares do nutriente micromineral essencial selênio para humanos e animais.



**“COMPOSIÇÕES CONTENDO *ALLIUM SATIVUM* LINN. (ALHO)
NATURALMENTE ENRIQUECIDAS COM COMPOSTOS ORGÂNICOS DE
SELÊNIO PARA SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL”**

Campo Técnico

- 5 A presente invenção diz respeito a composições de alho naturalmente enriquecidas com compostos orgânicos de selênio e a utilização dessas composições para a suplementação nutricional em humanos e animais.

Arte preliminar

- 10 O selênio é um micronutriente vital com múltiplos papéis no crescimento e funcionamento das células vivas em animais superiores e humanos. Em nível molecular, o selênio (como selenocisteína) é um componente essencial dos sítios seletivos da enzima antioxidante glutathione peroxidase e das enzimas que participam nas funções da tireóide iodotironina-5'-deiodinase e tioredoxina redutase de mamíferos. O selênio também está presente em diversas outras selenoproteínas
- 15 de mamíferos. A situação de baixo teor de selênio tem sido vinculada à ocorrência de imunidade reduzida contra doenças e a prevalência de várias formas de câncer.

- O selênio ocorre em alimentos, através da absorção pelas plantas a partir do solo, na forma dos selenoaminoácidos, selenometionina e selenocisteína e seus
- 20 derivados. Contudo, como o elemento é distribuído de forma desigual na crosta terrestre, a suplementação alimentar é frequentemente necessária. Os compostos orgânicos de selênio são preferidos para a suplementação em vista de sua biodisponibilidade superior. Um suplemento nutricional ideal seria a parte de uma planta comestível enriquecida com selênio na qual o selênio acumula-se
- 25 metabolicamente na forma de compostos orgânicos de selênio biodisponíveis.

Plantas que naturalmente contêm níveis mais elevados dos aminoácidos que contêm enxofre como aquelas das espécies *Allium* e *Brassica* são preferidas para o enriquecimento, com base em critérios metabólicos. Relata-se que o alho enriquecido com selênio é útil como suplemento nutricional na prevenção do câncer (Ip et al., 1992, 1996; Ip e Lisk, 1993, 1997; Lu et al., 1996).

Ensaio de intervenção clínica e dados *in vitro* revelaram a eficácia do selênio na forma de levedura de selênio ou selenometionina na prevenção do câncer (Clark et al., 1996, 1998), Ip et al (2000) descreveram o papel da especiação química na atividade comparativa do alho enriquecido com selênio e da levedura de selênio na prevenção do câncer de mama em ratos, em que o alho enriquecido com selênio mostrou ser mais eficaz do que a levedura de selênio. Relata-se que a γ -glutamil selenocisteína é a principal forma de selênio no alho enriquecido com selênio, enquanto que a L-selenometionina mostrou ser a principal forma de selênio na levedura enriquecida com selênio. Entretanto, os presentes inventores identificaram pela primeira vez a alilo-selenocisteína como outro selenoaminoácido importante presente nas cabeças de alho enriquecidas com selênio.

Estudos laboratoriais indicam que a γ -glutamil-Se-metil-L-selenocisteína é um agente quimiopreventivo eficaz, servindo como um veículo para a Se-metil-L-selenocisteína (Dong et al., 2001; Medina et al., 2001). A Se-metil-L-selenocisteína é um composto de organoselênio quimiopreventivo bem pesquisado, o qual não é incorporado nas proteínas do corpo e, portanto, é menos tóxico do que outras formas de selênio suplementar (Ip et al., 1994; Medina et al., 2001).

A solicitação de patente americana número 10/249,239 divulgou um novo processo para a preparação de cabeças de alho naturalmente enriquecidas com uma composição peculiar de compostos orgânicos de selênio através de uma técnica de

cultura sem terra. A solicitação de patente americana número 10/605,578 descreveu um processo para a preparação de um concentrado contendo compostos orgânicos de selênio extraídos de cabeças de alho enriquecidas oriundo da solicitação de patente americana número 10/249,239, para suplementação nutricional em humanos e animais.

Divulgação da Invenção

A invenção revela composições compreendendo ácido metilselênico, alio-selenocisteína, os selenoaminoácidos L-selenometionina e Se-metil-L-selenocisteína; e os dipeptídeos de selenoaminoácido, N-γ(L-glutamil) L-selenometionina e N-γ(L-glutamil)Se-metil-L-selenocisteína. Uma dispersão desses compostos é efetuada em pó de alho natural contendo 10 a 500 ppm de aliína, para suplementação nutricional.

O melhor modo de efetivar a invenção

Exemplo 1: Processo para preparar uma composição contendo compostos orgânicos de selênio bioativo seletivamente fracionados a partir de cabeças de *Allium sativum* Linn enriquecidas com selênio:

100 kg de cabeças de alho enriquecidas com selênio preparadas por uma técnica de cultura sem terra foram esmagadas e submetidas a extração multifásica por fluido supercrítico seguida por separação cromatográfica. Dióxido de carbono em alta pressão (10 a 60 MPa), modificado com etanol e água (50:50), foi utilizado para extrair o selênio contendo aminoácidos não protéicos bem como dipeptídeos de selenoaminoácido. Estes foram separados e purificados utilizando HPLC preparativo, a fase móvel e a água foram removidas por evaporação sob pressão reduzida e liofilização para produzir as frações de selenoaminoácido bioativo e de dipeptídeos de selenoaminoácido. As frações obtidas foram misturadas com alho natural em pó



para produzir uma composição contendo 100 a 2000 ppm de selênio na forma de compostos orgânicos de selênio.

Uma composição exemplar do concentrado de enriquecimento com selênio configurada para fornecer um teor de selênio orgânico de 1000 ppm em pó de alho

5 natural contendo 200 ppm de aliína é detalhada na Tabela 1.

Tabela 1: Composição do concentrado de enriquecimento

Tabela 1

Componente	Nível em ppm	Equivalente de selênio elementar (ppm)
Ácido metilselênico	25	15.6
Alilo-selenocisteína	378	143.6
Se-metil-L-selenocisteína	120	52.3
L-selenometionina	75	30.9
N-γ (L-glutamil) L-selenometionina	60	15.0
N-γ (L-glutamil) Se-metil-L-selenocisteína	344	87.0
	Total = 1002	344.4

Exemplo 2: Estudos toxicológicos sobre o alho em pó enriquecido com selênio

O estudo foi concebido para determinar a toxidez oral aguda do alho em pó enriquecido com a mistura do Exemplo 1, em ratos Sprague Dawley (machos e fêmeas) com idade de 6 a 8 semanas e com peso variando de 124,1 g a 140,6 g. Os ratos foram selecionados aleatoriamente em grupos de 5 do mesmo sexo.

A substância de teste suspensa em água foi administrada por via oral nos ratos, sob um volume de dosagem de 10 ml/kg. Dez ratos (5 machos e 5 fêmeas) foram



alocados para um tratamento com 2000 mg/kg da composição de teste. Os ratos foram observados por 14 dias após o tratamento. Todos os animais sobreviveram durante o período de estudo de 14 dias e encontravam-se livres de sinais de intoxicação 1 a 2 horas após o tratamento. O valor LD50 da composição nos ratos por administração oral mostrou ser maior do que 2000 mg/kg de peso corporal.

Exemplo 3: A eficácia clínica e segurança da composição

Objetivo do estudo: determinar a eficácia e segurança da composição na redução dos níveis de estresse oxidativo.

Delineamento do estudo: estudo unicêntrico, prospectivo e aberto de 42 dias para medir a eficácia e segurança da composição. Nesse estudo de 42 dias, cada paciente recebeu a composição (fornecendo 100 mcg de selênio elementar) em dose única, diariamente após uma refeição. Seleção de sujeitos: Os critérios de seleção estipulavam que os sujeitos possuísem um IMC (índice de massa corporal) de 20-38 kg/m², e estivessem na faixa etária de 35 a 60 anos, com risco aumentado de doença cardíaca. Esses sujeitos estariam, porém, com boa saúde, sem história de alcoolismo ou abuso de drogas e sem alergias conhecidas. As funções renal e hepática seriam normais. 13 sujeitos (na faixa etária de 25 a 43 anos, 6 homens e 7 mulheres) participaram do estudo.

Procedimentos do estudo: A eficácia foi avaliada com base na alteração do estresse oxidativo, como evidenciado através da medição do perfil antioxidante. A segurança foi avaliada com base na função hepática padrão e em testes da função renal.

Eventos adversos, caso ocorressem, eram registrados. A função hepática é avaliada por meio de marcadores enzimáticos específicos. Por exemplo, tanto a SGPT (glutamato-piruvato-transaminase sérica) quanto a SGOT (glutamato-oxaloacetato-transaminase sérica) são importantes no diagnóstico clínico de doenças. Essas



enzimas, particularmente abundantes no coração e fígado, são liberadas a partir de células lesadas no infarto do miocárdio, infecções, dano hepático ou doença cardiovascular. Testes da função renal buscam avaliar o quão bem os rins filtram e transportam resíduos metabólicos do sangue para a urina. Os níveis de creatinina sérica, uréia sérica e eletrólitos (sódio, potássio e cloreto) são medidos. A TSE (taxa de sedimentação de eritrócitos) e níveis de hemoglobina, caso normais, oferecem uma indicação da presença de doença.

Resultados: Eficácia: Do dia 0 (avaliação inicial) ao dia 21, e do dia 0 ao dia 42, a peroxidação lipídica plasmática teve redução média de 5,39 unidades e 9,28 unidades, respectivamente. Ambas as reduções foram estatisticamente significativas. A contagem de antioxidantes dos linfócitos para a glutathione-S-transferase e superóxido dismutase mostrou um aumento do dia 0 ao dia 21 e do dia 0 ao dia 42. Os valores da catalase reduziram-se durante esse período. Todas as diferenças médias desde a avaliação inicial mostraram ser estatisticamente significativas.

Segurança: Os valores laboratoriais dos parâmetros para a função hepática e função renal mostraram estar dentro de limites admissíveis, com pequenas alterações relatadas durante o estudo. A variação ficou dentro de 5% dos valores normais. Da mesma forma, os perfis lipídicos sanguíneos permaneceram dentro da faixa normal. Nenhum evento adverso foi observado em qualquer um dos sujeitos ou relatado durante o estudo.

Conclusões: Os resultados deste estudo clínico prospectivo sugerem que a composição reduz eficazmente os níveis de estresse oxidativo e é segura para uso como suplemento nutricional antioxidante.

Ainda que uma incorporação exemplar da composição e seu uso sejam



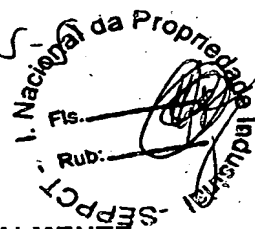
apresentados na invenção atual, a intenção é abranger todas modificações e alterações que caem dentro do escopo das reivindicações anexadas.

REIVINDICAÇÕES

1. **"ALHO ENRIQUECIDO COM UM CONCENTRADO DE COMPOSTOS DE SELÊNIO PARA SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL"**, caracterizado por compreender: de cerca de 10 ppm até cerca de 550 ppm de ácido metilselênico; de
5 cerca de 10 ppm até 500 ppm de alilo-selenocisteína; de cerca de 10 ppm até cerca de 500 ppm de L-selenometionina; de cerca de 10 ppm até cerca de 500 ppm de Se-metil-L-selenocisteína; de cerca de 10 ppm até cerca de 500 ppm de N-γ (L-glutamil) L-selenometionina; e de cerca de 10 ppm até cerca de 500 ppm de N-γ (L-glutamil) Se-metil-L-selenocisteína.
- 10 2. **"SUPLEMENTO ENRIQUECIDO COM SELÊNIO"**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo suplemento compreender também cerca de 10 ppm até cerca de 500 ppm de aliína.
3. **"SUPLEMENTO DE ALHO ENRIQUECIDO COM SELÊNIO"**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo suplemento encontrar-se na forma de pó e
15 fornece cerca de 100 ppm até cerca de 2000 ppm de selênio elementar.
4. **"SUPLEMENTO DE ALHO ENRIQUECIDO COM SELÊNIO"**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo suplemento compreender também um material de veículo farmacêuticamente aceitável.
5. **"SUPLEMENTO DE ALHO ENRIQUECIDO COM SELÊNIO"**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser administrado oralmente uma vez ao dia em
20 um sujeito humano ou animal para manutenção da saúde geral.
6. **"SUPLEMENTO DE ALHO ENRIQUECIDO COM SELÊNIO"**, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pela dosagem diária total ser dividida e administrada em porções durante o dia em humanos e animais.
- 25 7. **"SUPLEMENTO DE ALHO ENRIQUECIDO COM SELÊNIO"**, de acordo com a



reivindicação 1, **caracterizado** pela forma de dosagem ser comprimida em um tablete ou preenchida em uma cápsula gelatinosa macia ou dura, ou adicionada a um produto alimentício.

**RESUMO**

COMPOSIÇÕES CONTENDO *ALLIUM SATIVUM* LINN. (ALHO) NATURALMENTE ENRIQUECIDAS COM COMPOSTOS ORGÂNICOS DE SELÊNIO PARA SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL. A invenção divulga composições de alho enriquecidas

- 5 com selênio que são um meio seguro e eficaz de oferecer quantidades suplementares do nutriente micromineral essencial selênio para humanos e animais.