

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2010.09.02	(73) Titular(es): OMNIACTIVE HEALTH TECHNOLOGIES LTD. NEW TECHNOLOGY CENTRE PLOT A-10, ROAD NO 1, WAGLE INDUSTRIAL ESTATE THANE (W) MAHARASHTRA 400 604 IN
(30) Prioridade(s): 2009.09.02 IN MU20082009 2009.10.30 US 256667 P	(72) Inventor(es): K. SUNIL KUMAR T. IN SHERENA P. ABDULKADIR IN
(43) Data de publicação do pedido: 2012.07.11	(74) Mandatário: ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT
(45) Data e BPI da concessão: 2016.04.13 108/2016	

(54) Epígrafe: **UMA COMPOSIÇÃO DE XANTOFILA CONTENDO PIGMENTOS MACULARES E UM PROCESSO PARA A SUA PREPARAÇÃO**

(57) Resumo:

UMA COMPOSIÇÃO DE XANTOFILA QUE CONTÉM PIGMENTOS MACULARES, INCLUINDO TRANS-LUTEÍNA E ISÓMEROS DE ZEAXANTINA, NOMEADAMENTE (R,R)-ZEAXANTINA E (R,S)-ZEAXANTINA, DERIVADOS DO EXTRATO/OLEORESINA DE PLANTA CONTENDO XANTOFILAS/ÉSTERES DE XANTOFILAS, A QUAL É SEGURA PARA CONSUMO HUMANO E ÚTIL PARA NUTRIÇÃO E CUIDADOS DE SAÚDE. A COMPOSIÇÃO TEM PELO MENOS 80% EM PESO QUE CORRESPONDE ÀS XANTOFILAS TOTAIS, DAS QUAIS A RAZÃO ENTRE A TRANS-LUTEÍNA E OS ISÓMEROS DE ZEAXANTINA ESTÁ NA GAMA DE CERCA DE 4:1 ATÉ CERCA DE 6:1 E EM QUE A RAZÃO DOS ISÓMEROS DE ZEAXANTINA ESTÁ NA GAMA DE CERCA DE 80 PARA 20:20 PARA 80.

RESUMO**"UMA COMPOSIÇÃO DE XANTOFILA CONTENDO PIGMENTOS MACULARES E
UM PROCESSO PARA A SUA PREPARAÇÃO"**

Uma composição de xantofila que contém pigmentos maculares, incluindo trans-luteína e isómeros de zeaxantina, nomeadamente (R,R)-zeaxantina e (R,S)-zeaxantina, derivados do extrato/oleoresina de planta contendo xantofilas/ésteres de xantofilas, a qual é segura para consumo humano e útil para nutrição e cuidados de saúde. A composição tem pelo menos 80% em peso que corresponde às xantofilas totais, das quais a razão entre a trans-luteína e os isómeros de zeaxantina está na gama de cerca de 4:1 até cerca de 6:1 e em que a razão dos isómeros de zeaxantina está na gama de cerca de 80 para 20:20 para 80.

DESCRIÇÃO**"UMA COMPOSIÇÃO DE XANTOFILA CONTENDO PIGMENTOS MACULARES E UM PROCESSO PARA A SUA PREPARAÇÃO"****• Campo da Invenção:**

A presente invenção refere-se a uma composição de xantofila contendo pigmentos maculares e um processo para a sua preparação. A invenção refere-se em particular a uma composição de xantofila contendo pigmentos maculares constituídos por trans-luteína e isómeros de zeaxantina e a um processo para a sua preparação. Esta invenção refere-se, mais particularmente, a uma composição de xantofila contendo pigmentos maculares constituídos por trans-luteína, isómeros de zeaxantina, nomeadamente (R,R)-zeaxantina e (R,S)-zeaxantina derivados do extrato/oleoresina de planta contendo xantofilas/ésteres de xantofilas, a qual é segura para consumo humano e útil para aplicações nutricionais e de saúde. Mais particularmente, a presente invenção refere-se a uma composição de xantofila contendo pelo menos 80% em peso de xantofilas totais, das quais o teor de trans-luteína é pelo menos 80% sendo o restante isómeros de zeaxantina, nomeadamente (R,R)-zeaxantina e (R,S)-zeaxantina derivados dos extratos de planta/oleoresinas contendo xantofilas/ésteres de xantofilas, a qual é segura para consumo humano e útil para aplicações nutricionais e de saúde.

A composição de xantofila da presente invenção é útil como um ingrediente em aplicações nutricionais e de saúde, como um aditivo e/ou corante para alimentos ou aplicações alimentares.

- **Antecedentes da Invenção:**

A mácula está no centro da retina, diretamente por trás da lente no olho. É uma área pequena com uma cor amarela constituída por xantofilas como luteína, (R,R)-zeaxantina e (R,S)-zeaxantina e por isso chamadas de xantofilas maculares. Estas atuam como anti-oxidantes protegendo a retina de degradação oxidativa e ajudam na visão aguçada necessária à leitura, escrita, condução e visão clara de objetos. Uma lesão lenta e constante durante a vida da mácula pode levar a uma degeneração macular relacionada com a idade (AMD) e à catarata. As xantofilas maculares na dieta ou num suplemento podem ajudar na manutenção de olhos saudáveis. A luteína e (R,R)-zeaxantina podem ser derivados de frutos e vegetais, enquanto a (R,S)-zeaxantina pode ser derivada de alimentos marinhos ou de suplementos alimentares detéticos, ou a partir da bio-conversão de luteína no interior do corpo. Das várias classes de pigmentos, os carotenóides estão entre os mais amplamente distribuídos na natureza com cor vermelha, amarela e laranja tendo funções variadas como a captação de luz e a proteção contra a foto-oxidação destrutiva nas plantas terrestres.

Apesar de terem sido identificados carotenóides específicos em várias frutas e vegetais, penas de aves, gema de ovo, pele de aves domésticas, crustáceos e na região macular do olho, eles são especialmente abundantes em pétalas de calêndula, milho e legumes de folhas. A correlação entre os carotenóides dietéticos e os carotenóides encontrados no soro e no plasma humano indicam que apenas grupos selecionados de carotenóides entram na corrente sanguínea humana para exercerem o seu efeito. Cada carotenóide mostra um padrão individual de absorção, de transporte no plasma e metabolismo.

Os carotenóides absorvem luz na região dos 400-500 nm do espectro visível. Esta propriedade física transmite a cor amarelo/vermelho característica aos pigmentos. Os carotenóides contêm uma estrutura conjugada composta por unidades de isopreno, que são geralmente invertidas no centro da molécula, transmitindo simetria. Alterações na configuração geométrica em torno das ligações duplas resultam na existência de muitos isômeros cis e trans. As espécies de mamíferos não sintetizam carotenóides e portanto estes têm que ser obtidos de fontes alimentares tais como frutas, vegetais e gemas de ovos. Nos últimos anos tem sido relatado que os carotenóides têm vários benefícios para a saúde, que incluem prevenção e ou proteção contra desordens de saúde graves.

Os carotenóides são compostos não polares

classificados em duas sub-classes, nomeadamente compostos polares designados xantofilas ou oxi-carotenóides e carotenos hidrocarbonetos não polares como beta-caroteno, licopeno, etc. Ambas as sub-classes têm, pelo menos, nove ligações duplas conjugadas responsáveis pelas cores características dos carotenóides. As xantofilas têm estruturas de anel na extremidade da cadeia de ligações duplas conjugadas com funções polares como grupo hidroxilo ou ceto. Os exemplos de xantofilas incluem luteína, zeaxantina, capsantina, cantaxantina, beta-criptoxantina, astaxantina, etc. Como corantes naturais e também devido ao seu papel na saúde humana, xantofilas como luteína, (R,R)-zeaxantina e (R,S)-zeaxantina têm atraído nos últimos anos a atenção renovada de cientistas e investigadores nos campos biomédico, químico e nutricional.

A luteína e a zeaxantina contribuem para as cores amarelo e amarelo alaranjado, respetivamente. A luteína e a zeaxantina podem estar presentes em material vegetal na forma livre e também na forma de éster. A luteína está presente em vegetais de folhas verdes como espinafre, couve e brócolos na forma livre; frutos como manga, laranja e papaia; paprica vermelha, algas, milho amarelo contêm luteína na forma dos seus ésteres. Está também presente na corrente sanguínea e em vários tecidos do corpo humano e, particularmente, na mácula, lente e retina do olho.

A luteína é quimicamente designada como beta- ϵ -caroteno 3,3'-diol. A zeaxantina é formada pela adição de

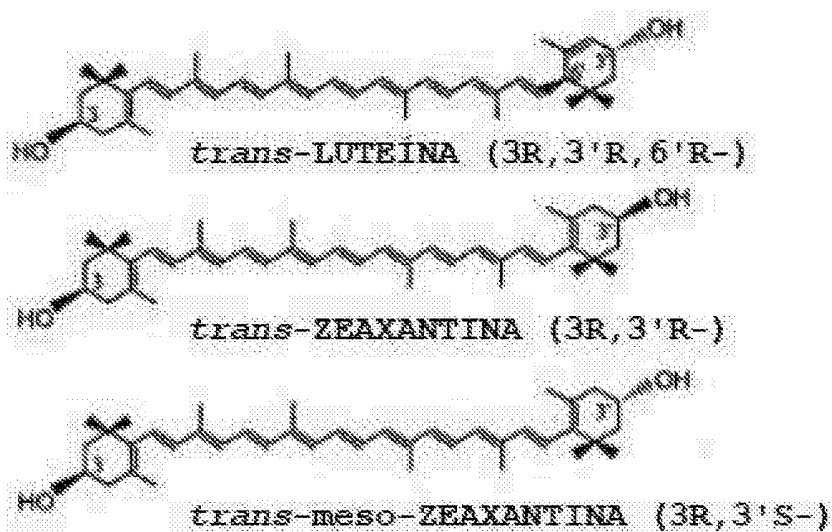
dois grupos hidroxí ao beta-caroteno. Uma vez que as posições hidroxí estão nas posições 3 e 3', o nome químico para a zeaxantina é beta, beta-caroteno-3,3'-diol. O nome comum da zeaxantina é derivado de *zea mays* porque este carotenóide foi pela primeira vez identificado em milho (*Zea mays*).

Pode ser visto abaixo que a luteína não é simétrica, uma vez que a posição da ligação dupla no anel esquerdo não é idêntica à posição da ligação dupla no anel direito. A zeaxantina é completamente simétrica no que diz respeito aos anéis esquerdo e direito devido a uma ligação dupla conjugada adicional em comparação com a luteína.

As xantofilas podem mostrar ambos os isómeros, óticos (estéreo isómeros R- e S-) e geométricos (trans, E- e cis, Z-). A conformação dos estereo isómeros R- e S- baseia-se em estudos espectrais CD e quirais em coluna de HPLC enquanto a conformação de isómeros cis e trans baseia-se em estudos de espectroscopia *online* electrónicos, de infravermelhos, de NMR, de HPLC-MS e de HPLC-NMR. É bem sabido que quando uma molécula orgânica tem um átomo de carbono com quatro tipos diferentes de átomos ou grupos ligados a ele, esse átomo de carbono é designado como átomo de carbono quiral. O átomo de carbono quiral é responsável por dois arranjos espaciais diferentes, levando à formação de isómeros óticos, enquanto o número de ligações duplas da cadeia de polieno e a presença de um grupo metilo e a ausência de impedimento estérico determina o número de isómeros trans e cis. No caso da trans-zeaxantina, os

átomos de carbono nas posições 3 e 3' nos dois anéis terminais são ambos átomos quirais.

Assim, a trans-zeaxantina tem dois centros quirais nos átomos de carbono C3 e C3', com base nas posições dos grupos hidroxil secundários ligados aos mesmos. Portanto, há quatro estereoisômeros possíveis de trans-zeaxantina, nomeadamente isômero (3R-3'R), isômero (3S-3'S) e isômero (3R-3'S) ou (3S-3'R). Nestes isômeros, (3R-3'S) e (3S-3'R) são idênticos. Portanto, existem três isômeros quirais de trans-zeaxantina. O isômero que provoca a rotação de luz polarizada no sentido dos ponteiros do relógio é designado por estereoisômero R, o isômero que provoca a rotação no sentido oposto aos ponteiros do relógio estereoisômero S e o terceiro isômero possui efeitos opostos duplos (R,S; opticamente inativo), que é designado de meso-forma de zeaxantina. As fórmulas estruturais de luteína, (R,R)-zeaxantina e (R,S)-meso zeaxantina são dadas abaixo.



Estruturas químicas de xantofilas maculares

As ligações duplas conjugadas da luteína e da zeaxantina contribuem para as cores distintas de cada pigmento e também influenciam a sua capacidade para extinguirem o oxigénio singeleto. Devido à ligação dupla conjugada extra, crê-se que a zeaxantina é um anti-oxidante mais forte comparativamente à luteína.

O pigmento macular do olho é composto principalmente por três pigmentos de xantofila (ou xantofilas maculares), nomeadamente (3R,3'R,6'R)-luteína, (3R,3'R)-zeaxantina e (3R,3'S)-zeaxantina na ordem dos 36, 18 e 18% do teor total de carotenóides da retina, juntamente com os 20% restantes constituídos por carotenóides menores, como oxo-luteína, epi-luteína e ϵ -,- ϵ -caroteno 3,3'-diona (J. T. Landrum and R. A. Bone, Lutein, Zeaxanthin and the Macular Pigment, Arch. Biochem. Biophys., 385, 28-40, 2001).

Embora estes pigmentos de xantofila sejam encontrados nos tecidos do olho, a concentração mais elevada é vista na região da mácula lútea da retina, incluindo uma depressão central na retina chamada fóvea. A concentração de pigmentos de xantofila aumenta progressivamente em direção ao centro da mácula e na fóvea, sendo a concentração destes pigmentos de xantofila aproximadamente mil vezes mais elevada do que em outros tecidos humanos (Landrum et al., Analysis of Zeaxanthin Distribution within Individual Human Retinas, Methods in Enzymology, L. Packer (editor) 213A, 457-467, Academic Press, 1992). A fóvea é uma área relativamente pequena no

interior da mácula, na qual os cones foto-recetores atingem a sua concentração máxima. Cerca de 50% das quantidades totais das xantofilas estão concentradas na mácula, onde a zeaxantina domina sobre a luteína numa razão de 2:1 (Handelman et al., Measurements of Carotenoids in Human and Monkey Retinas, in Methods in Enzymology, L. Packer (editor) 213A, 220-230, Academic Press, NY, 1992; Billsten et al., Photophysical Properties of Xanthophylls in Carotene Proteins from Human Retina, Photochemistry and Photobiology, 78, 138-145, 2003). No centro da fóvea da retina, a zeaxantina é uma mistura a 50:50 de (trans-3R,3'R)-zeaxantina e (trans-3R,3'S)-zeaxantina, juntamente com uma pequena quantidade de (3S,3'S)-zeaxantina (J.T. Landrum and R.A. Bone, Lutein, Zeaxanthin and The Macular Pigment, Arch. Biochem. Biophys., 385, 28-40, 2001).

A fóvea é particularmente importante para uma função visual adequada (por exemplo, acuidade), sendo a doença e lesões nesta área conhecidas por resultarem em cegueira legal. Por exemplo, a degeneração macular relacionada com a idade (AMD) é caracterizada por alterações patológicas na retina, epitélio pigmentado da retina (RPE) e/ou coróides e afeta preferencialmente a região macular da retina. Esta é a principal causa de perda de visão irreversível nos Estados Unidos das pessoas com mais de 65 anos de idade e não há nenhum tratamento estabelecido disponível para a maioria dos pacientes. A perda de visão central resulta na possível incapacidade de se reconhecer rostos, ler ou escrever, ou conduzir um carro

e tem, portanto, um efeito significativo na capacidade de um indivíduo viver de forma independente. Existe uma ampla evidência epidemiológica que suporta um papel da ingestão alimentar de luteína e zeaxantina em diferentes formas isoméricas na proteção contra as cataratas relacionadas com a idade e degeneração macular. A detecção de produtos de oxidação de luteína e zeaxantina na retina humana suporta a hipótese de que a luteína e a zeaxantina dietéticas podem atuar como antioxidantes na região macular (Khachik et al., Identification of Lutein and Zeaxanthin Oxidation Products in Human and Monkey Retinas, Invest. Ophthalmol. and Vis. Sci., 38, 1802-1811, 1997).

Dos 40 a 50 carotenóides tipicamente consumidos na dieta humana, a luteína e a zeaxantina são depositadas até um teor 5 vezes superior na região macular da retina comparativamente à retina periférica. A zeaxantina é preferencialmente acumulada na região da fóvea, ao passo que a luteína é abundante na região perifoveal.

No que diz respeito à localização de xantofilas a nível celular, é relatado que elas estão ligadas a proteínas específicas referidas como proteína de ligação a xantofilas (XBP). É sugerido que a XBP está envolvida na absorção de luteína e de zeaxantina a partir da corrente sanguínea e na estabilização da mesma na retina. O estudo de xantofilas e XBP por espectroscopia de absorção transiente na gama dos femtossegundos mostrou melhor estabilidade para XBP enriquecida com (3R,3'S)-zeaxantina em comparação

com (3R,3'R)-zeaxantina, enquanto as propriedades fotofísicas das xantofilas: (3R,3'R)-zeaxantina e (3R,3'S,meso)-zeaxantina são geralmente idênticas. É provável que a meso-zeaxantina seja melhor acomodada com XBP, onde a proteína protege as xantofilas de degradação por radicais livres. Assim, o complexo pode ser um melhor antioxidante do que as xantofilas livres, facilitando uma proteção melhorada do tecido ocular de danos oxidativos (Billsten et al., *Photo-physical Properties of Xanthophyls in Caroteno proteins from Human Retina, Photochemistry and Photobiology*, 78, 138-145, 2003).

Têm sido atribuídas várias funções aos pigmentos maculares, incluindo a redução dos efeitos danosos da foto-oxidação devido à luz azul absorvida pelo olho, a redução dos efeitos de difusão da luz e a aberração cromática no desempenho visual, e a proteção contra os efeitos adversos das reações fotoquímicas devido às propriedades antioxidantes dos carotenóides.

Tem sido demonstrada a capacidade para se aumentar a quantidade de pigmento macular por complemento alimentar com luteína (Landrum et al., *Dietary Lutein Supplementation Increases Macular Pigment, FASEB. J*, 10, A242, 1996). A função de visão reduzida devido a catarata e a cegueira em adultos devido a AMD podem ser substancialmente controladas por consumo de frutas e vegetais e suplementos dietéticos contendo luteína e (R,R)-zeaxantina e (R,S)-zeaxantina disponíveis a partir de alimentos do mar

negados pela população vegetariana. Embora a (R,S)-zeaxantina presente no olho seja considerada um produto metabólico proveniente da luteína, a necessidade de suplemento dietético de (R,S)-zeaxantina é agora reconhecida por melhorar a densidade do pigmento macular (Landrum and Bone, *Functional Foods and Nutraceuticals*, 1 de setembro de 2001). Do mesmo modo, o estudo mostrou que a (R,R)-zeaxantina ganha entrada no sangue e finalmente na mácula (Breithaupt et al., *Comparison of Plasma Responses in Human subjects after the Ingestion of (3R,3'R)-zeaxanthin Dipalmitate from Wolfberry(Lycium barbarum) and Non-esterified (3R,3'R)-zeaxanthin using Chiral HPLC*, *Brit. J. Nutr.* 91, 707-713, 2004). Ensaio com suplementos dietéticos de luteína e zeaxantina em humanos mostraram que aumentam a densidade de pigmento macular e as concentrações no soro destes carotenóides (Bone et al., *Lutein and Zeaxanthin Dietary Supplements Raise Macular Pigment Density and Serum Concentrations of These Carotenoids in Humans*, *J. Nutr.*, 133, 992-998, 2003).

- **Fontes Alimentares de Luteína e Zeaxantina**

A luteína é um carotenóide comum encontrado na maior parte das frutas e vegetais, enquanto a zeaxantina na forma de isômero (R,R) está presente apenas em quantidades diminutas na maior parte das frutas e vegetais. As fontes alimentares de zeaxantina são limitadas a verdes, certas frutas amarelas/laranjas e vegetais como milho, nectarinas, laranjas, papaia, diospiros e abóbora. O capsicum annum é

outra especiaria comum amplamente utilizada, que é uma boa fonte de zeaxantina. Wolfberry (*Lycium barbarum*), fructus lycii ou planta Gou Qi Zi têm pequenos frutos vermelhos que são geralmente utilizados na comida caseira chinesa e tem sido demonstrado que têm um elevado teor de zeaxantina (principalmente como dipalmitato de zeaxantina), mas quantidades insignificantes de luteína. O fruto seco de wolfberry é prescrito pelos herboristas chineses como um agente terapêutico para um grande número de doenças oculares. Em França, o dipalmitato de luteína (Helenien) isolada a partir das folhas de flor de *Helenium autumnale* é relatado por ser utilizado no tratamento das desordens visuais (Wolfgang Gau, Hans-Jurgen Ploschke and Christian Wunsche, Mass Spectrometric Identification of Xanthophylls Fatty Acid Esters From Marigold Flowers (*Tagetes erecta*) Obtained by HPLC and Craig Counter Current Distribution, J. Chrom. 262, 277-284, 1983).

Como já foi anteriormente mencionado, a fonte alimentar de meso-zeaxantina é principalmente a partir de alimentos do mar como camarões, peixe, tartaruga, etc., pelo que a população vegetariana é privada de meso-zeaxantina. Contudo, existe uma patente disponível para uma composição farmacêutica contendo meso-zeaxantina para o tratamento de desordens da retina como o aumento da deposição de pigmentos maculares no olho humano e para o tratamento terapêutico ou profilaxia de AMD (Howard et al., Meso-zeaxanthin Formulations for Treatment of Retinal Disorders, Pat. dos EUA No. 6.329.432.2001).

A luteína e a zeaxantina ocorrem naturalmente na forma isomérica trans em frutas, vegetais e flores (calêndula). Por causa das condições de processamento devido ao calor e à luz, uma pequena percentagem da forma isomérica trans é convertida na cis. Portanto, a forma biodisponível preferida é a isomérica trans, conforme evidenciado a partir dos dados de análise da composição dos isómeros geométricos de plasma humano (Khachik et al., Isolation and Structure Elucidation of Geometric Isomers of Lutein, Zeaxanthin in Extracts of Human Plasma, J. Chrom. 582, 153-156, 1992). Nesta perspectiva, é desejável utilizar a forma isomérica trans de luteína e zeaxantina como (R,R)-, (R,S)- nos suplementos dietéticos.

Até à data, pouco se sabe sobre o mecanismo de formação, absorção e deposição de meso-zeaxantina na retina do olho. Khachik et al. relataram a presença de 2-3% de (3R,3'S, meso)-zeaxantina em vinte amostras de plasma humano normal e propuseram as vias metabólicas da sua formação a partir de dieta de luteína e zeaxantina. Não é claro se a deposição de meso-zeaxantina nas vias da retina é através de soro ou se é produzida a partir de luteína/zeaxantina no interior da retina (Khachik et al., num capítulo sobre Dietary carotenoids and their metabolites as potentially useful chemo protective agents against cancer, em "Antioxidant food supplement in human health", Eds. Packer et al., Academic Press London, páginas 203-29, 1999). Contudo, Breithaupt et al. não encontraram a

presença de meso-zeaxantina no plasma humano obtido 24 horas após a ingestão de (3R,3'R)-zeaxantina (éster ou forma livre) num só estudo cruzado cego utilizando-se dois grupos, cada um constituído por seis voluntários. Utilizou-se LC-ApcI-MS quiral para a deteção na amostra de plasma combinada (Breithaupt et al., Comparison of plasma responses in human subjects after the ingestion of 3R,3'R-zeaxanthin Dipalmitate from Wolfberry (*Lycium barbarum*) and Non-esterified 3R,3'R-zeaxanthin using Chiral HPLC, *Brit. J. Nutr.* 91, 707-713, 2004).

Há evidências e razões que suportam a hipótese de que os carotenóides luteína, zeaxantina e meso-zeaxantina se encontram facilmente biodisponíveis e, conseqüentemente, aumentam os níveis de pigmento macular (Landrum and Bone, Meso-zeaxanthin-A Cutting Edge Carotenoid, *Functional Foods and Nutraceuticals*, 10 de setembro de 2001; Bone et al. Macular Pigment Response to a Supplement Containing Meso-zeaxanthin, *Nutr. Metabol.* 11.1-8 (2007); Bone et al., Macular Pigment Response to a Xanthophyll Supplement of Lutein, Zeaxanthin and Meso-zeaxanthin, *Proc. Nutr. Soc.*, 105A (2006); Thurnham et al., Macular Zeaxanthin and Lutein - a Review of Dietary Sources and Bio-availability and Some Relationship with Macular Pigment Optical Density and Age-related Macular Disease, *Nutr. Res. Reviews*, 20, 163-179 (2007); Thurnham et al., A Supplementation Study in Human Subjects with a Combination of meso-zeaxanthin, (3R,3'R)-Zeaxanthin and (3R,3'R,6'R)-Lutein, *Brit. J. Nutr.*, 99, 1-8, 2008); E.E. Connolly et al., Augmentation of macular

pigment following supplementation with all three carotenoids: An exploratory study, *Current Eye Res.*, 35, 335-351 (2010)).

Nos dias de hoje, há uma elevada procura de cristais de xantofila contendo quantidades elevadas de trans-luteína e/ou zeaxantina para o seu uso como anti-oxidantes, prevenção de cataratas e degeneração macular, como agentes preventivos de cancro do pulmão, como agentes para a absorção de luz ultravioleta prejudicial dos raios solares e inibidores de radicais livres foto-induzidos e de espécies de oxigénio reativas, etc. Encontra-se agora disponível uma série de produtos comerciais a partir de fontes naturais para facilitar a formulação de produtos industriais e comerciais com luteína ou (R,R)-zeaxantina. Contudo, que seja do nosso conhecimento, não está disponível uma composição de xantofila contendo todas as xantofilas maculares essenciais e concentrações elevadas de particularmente trans-luteína, em pelo menos 85%, e sendo o restante constituído por (R,R)-zeaxantina e (R,S)-zeaxantina em razões iguais ou superiores derivadas da mesma fonte natural (pétalas de flores de calêndula) como luteína ou zeaxantina comercial. Encontrou-se evidência do papel protetor de trans-luteína, (R,R)-zeaxantina e (R,S)-zeaxantina na manutenção da saúde dos olhos com base na correlação entre os suplementos dietéticos vs. níveis no soro e densidade do pigmento macular (Bone et al., *Macular Pigment Response to a Supplement Containing Meso-zeaxanthin, Lutein and Zeaxanthin*, *Nutr. Metabol.* 11.1-8

(2007); Bone et al., Macular Pigment Response to a Xanthophyll Supplement of Lutein, Zeaxanthin and Meso-zeaxanthin, Proc. Nutr. Soc., 105A (2006); Thurnham et al., A Supplementation Study in Human Subjects with a Combination of Meso-zeaxanthin, (3R,3'R)-zeaxanthin and (3R,3'R,6'R)lutein, Brit. J. Nutr. 99, 1-8 (2008)).

Técnica Anterior:

O pigmento macular do olho é composto principalmente por luteína, (R,R)-zeaxantina e (R,S)-zeaxantina na razão aproximada de 2:1:1 na retina. Estes pigmentos representam 72% do total de carotenóides no olho, sendo o resto outros carotenóides (Landrum and Bone, Lutein Zeaxanthin and the Macular Pigments, Arch. Biochem. Biophys. 385, 28-40, 2001). O pigmento de xantofilas predominante na dieta é a luteína e vem das frutas e vegetais. O consumo médio de luteína nos EUA é entre 1-3 mg por dia, o que inclui cerca de 10-20% de (R,R)-zeaxantina (E.Y. Chew and San Gio Vanni, "Lutein" in Encyclopedia of Dietary Supplements, páginas 409-420, 2005 publicado pela Marcel Dekker). A (R,S)-zeaxantina não é encontrada na dieta normal, mas está presente em certos alimentos do mar como camarão, peixe e tartaruga (Maoka et.al., The First Isolation of Enantiomeric and Meso-zeaxanthin in Nature, Comp. Biochem. Physiol., 83B, 121-124, 1986). Nos últimos anos, tem sido reportado que estão presentes quantidades substanciais de zeaxantina, nomeadamente (R,R)-zeaxantina e (R,S)-zeaxantina, nas gemas dos ovos de galinha no México

originárias de rações de galinha contendo (R,R)-zeaxantina e (R,S)-zeaxantina (Thurnham et al., A Supplementation Study in Human Subjects with a Combination of Meso-zeaxanthin, (3R,3'R)-zeaxanthin and (3R,3'R,6'R)-luteína, Brit. J. Nutr., 99, 1-8 (2008)). Durante os últimos 5 anos, suplementos alimentares contendo (R,S)-zeaxantina têm estado disponíveis nos mercados norte-americano vendidos sob as marcas "Lutein Plus" e "LMZ3" e na Europa como "Lutein Plus" e "Macushield".

Além disso, existem formulações farmacêuticas contendo (R,S)-zeaxantina para o aumento da densidade do pigmento macular no olho humano e para o tratamento terapêutico ou profilaxia de doenças e desordens da mácula (Howard et al., Meso-zeaxanthin Formulations for Treatment of Retinal Disorders, Patente dos EUA No. 6.379.432, 2001). Os suplementos dietéticos de luteína contêm principalmente 80-90% de luteína e baixas quantidades de zeaxantina e ausência total de (R,S)-zeaxantina. Composição de xantofila de amostras combinadas: nomeadamente, Lutein Plus; luteína 50%, (R,R)-zeaxantina 13% e (R,S)-zeaxantina 37%; luteína 54%, (R,R)-zeaxantina 6% e (R,S)-zeaxantina 40% (Thurnham et al., A Supplementation Study in Human Subjects with a Combination of Meso-Zeaxanthin, (R,R)-zeaxanthin and Lutein, Brit. J. Nutr., 99, 1-8 (2008); Quantum Nutritionals, MI 48390, EUA; Luteína 25%, (R,R)-zeaxantina 6% e (R,S)-zeaxantina 68% (Bone et al., Macular Pigment Response to a Supplement Containing Meso-zeaxanthin, Lutein and Zeaxanthin, Nutri. Metabol 4, 12, 2007); Meso-

zeaxanthin Concentrate, luteína 5%, (R,R)-zeaxantina 5% e (R,S)-zeaxantina 85%; gema de ovo liofilizada de ovos de galinha, luteína 34%, (R,R)-zeaxantina 12,80% e (R,S)-zeaxantina 7,20% e outros carotenóides (Thurnham, Macular Zeaxanthin and Lutein - A Review of Dietary Sources and Bio-availability and Some Relations with MPOD and ARMD, Nutri. Res. Reviews, 20, 163-179, 2007). (R,S)-Zeaxantina pura tem mais de 99% de pureza (Schlatterer et al., Quantification of (3R,3'R)-zeaxanthin in Plant Derived Food by diastereoisomeric dilution assay applying Chiral HPLC, J. Chromatography A, 1137, 216-222, 2006); (R,S)-zeaxantina (sintética) 99% (Ernst et al., Patente dos EUA No. 6.743.954, 2004); composição de xantofila, luteína 3,53%, (R,R)-zeaxantina 5,77% e (R,S)-zeaxantina 90,57% (Kumar et al., Publicação do Pedido de Patente dos EUA No. 2007/0265351). Recentemente foi relatada uma combinação de formulação de cobeadlet de suplementos dietéticos constituída por 2 mg de luteína, 0,5 mg de zeaxantina e 0,5 mg de (R,S)-zeaxantina inibir o processo de degeneração macular e promover uma visão saudável (Lang, Composition and methods for inhibiting the progression of macular degeneration and promoting healthy vision, Patente dos EUA No. 7,267,830, 2007). Na patente dos EUA 6 743 953 é divulgado um processo para a preparação de cristais de xantofila compreendendo pelo menos 85% de xantofilas, das quais o teor de trans-luteína é pelo menos 90%, sendo as restantes zeaxantina, quantidades vestigiais de cis-luteína e de outros carotenóides.

Já em 1946, Karrer e Jucker relataram a reação de isomerização catalisada por etóxido de sódio de luteína em zeaxantina (P. Karrer e E. Jucker, *Helv. Chim. Acta*, 30, 266, 1947). Mais tarde, em 1971-1972, Buchecker et al. atribuíram a quiralidade R à luteína com base na análise de PMR mas as tentativas para isomerizarem a luteína em R,R-zeaxantina falharam (*Chimia*, 25, 192, 1971; *ibid*, 26, 134, 1972). Andrewes et al. relataram os aspetos estereoquímicos da reação de isomerização de (3R,3'R,6R)-luteína (oticamente ativa), que resultou em (3R,3'S)-zeaxantina, a qual era isomérica trans e oticamente inativa com base em estudos espectrais de CD (Isomerization of Epsilon-carotene to Beta-carotene and Lutein to Zeaxanthin, *Acta Chem. Scand.*, B28, 139, 1974). O processo anterior resulta num baixo rendimento, de 10 a 15% de (3R,3'S,meso)-zeaxantina oticamente inativa, e utiliza benzeno e DMSO que são questionáveis para uso nos suplementos alimentares e de saúde.

Rodriguez descreveu um método de isomerização de luteína para se produzir uma mistura de epímeros de zeaxantina através do emprego de meio não aquoso e aquecimento de uma mistura de álcali e propilenoglicol. Apesar do espectro de dicroísmo circular ter indicado a formação de meso-isómero de zeaxantina, não foram feitas tentativas para se quantificar o teor de meso-zeaxantina e também proporcionar a composição dos produtos isomerizados (Patente dos EUA No. 5.973.211, 1999). De acordo com o nosso conhecimento, não foi até agora relatada composição

de xantofila de grau alimentar contendo pelo menos 80% em peso de xantofilas totais, níveis mais elevados de teor de trans-luteína (70 a 80%) e sendo o restante (R,R)-zeaxantina e (R,S)-zeaxantina. Tal composição formará suplementos alimentares ideais e essenciais que ajudam na manutenção de uma visão saudável. Além disso, a composição pode ser considerada segura com base nos fatores que apoiam os reagentes empregues no processo e os dados disponíveis na literatura relativos à segurança toxicológica para as xantofilas individuais semelhantes (Kruger et al., Food & Chem. Toxicol., 40, 1535-1549 (2002); Chang, Thirteen week Toxicity of Meso-zeaxanthin in Han Wister Rats with a Four Week Recovery Gene Logic No.156704370 (2006)).

Os seres humanos consomem 1 a 3 mg de luteína por dia e a proporção de luteína: zeaxantina na dieta é cerca de 5:1 (Petra A Thürmann, Wolfgang Schalch, Jean-Claude Aebischer, Ute Tenter e William Cohn, Plasma Kinetics of lutein, zeaxanthin, and 3-dehydro-lutein after multiple oral doses of a lutein supplement, American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 82, No. 1, 88-97, julho de 2005; Nebeling LC., Forman MR, Graubard BI, Snyder RA, Changes in carotenoid intake in the United States: the 1987 and 1992 National Health Interview Surveys, J. Am. Diet. Assoc., 991-6, 1997; Le Marchand L, Hankin JH, Bach F, et al., An ecological study of diet and lung cancer in the South Pacific, Int. J. Cancer, 63, 18-23, 1995; Mohamedshah F, Douglas JS, Amann MM, Heimbach JM, Dietary intakes of lutein + zeaxanthin and total carotenoids among Americans age 50 and above, FASEB J., 13, A554 (abstr), 1999).

A razão luteína:zeaxantina no plasma é de 4 ou 5:1 (Emily Chew and John Paul SanGiovanni, in *Encyclopedia of Dietary Supplements*, Ed. Paul Coates, Marcel Dekker, páginas 409-421, 2005).

Nas circunstâncias acima explicadas, é desejável e útil para a indústria e para os formuladores de produtos nutricionais ter um concentrado de xantofila constituído por todas as xantofilas maculares obtidas a partir de um processo escalável comercialmente, e feito a partir de material de fonte natural idêntico ao que já é aceite pelo mercado para a luteína, (R,R)-zeaxantina e (R,S)-zeaxantina. O produto preparado deve ter uma razão luteína:zeaxantina de 5:1, conforme encontrado na dieta regular e no plasma. O produto assim preparado deve também ser sintetizado a partir de solventes seguros (GRAS) para a produção de suplementos alimentares adequados para o consumo humano, com resíduos mínimos de solventes e especificações de luteína e isómeros de zeaxantina tendo em mente a função visual e os requisitos do mercado.

- **Objetivos da presente Invenção:**

Por conseguinte, o principal objetivo da presente invenção é proporcionar uma composição de xantofila contendo pigmentos maculares constituídos por trans-luteína e isómeros de zeaxantina, nomeadamente (R,R)-zeaxantina e (R,S)-zeaxantina, derivados do extrato/oleoresina de planta

contendo xantofilas/ésteres de xantofilas, a qual é segura para o consumo humano e útil para nutrição e cuidados de saúde, que compreende pelo menos 80% em peso de xantofilas totais, das quais a razão entre trans-luteína e os isómeros de zeaxantina está na gama de 4:1 a 6:1 e a razão dos isómeros de zeaxantina está na gama de 80 para 20:20 para 80.

Ainda outro objetivo da presente invenção é proporcionar uma composição de xantofila conforme acima definido, contendo pelo menos 85% em peso de xantofilas totais, das quais o teor de trans-luteína é pelo menos 85% em peso, sendo os restantes 15% isómeros de zeaxantina, nomeadamente, (R,R)-zeaxantina e (R,S)-zeaxantina, derivados do extrato/oleoresina de planta contendo xantofilas/ésteres de xantofilas, a qual é segura para consumo humano e útil para nutrição e cuidados de saúde.

Ainda um outro objetivo da presente invenção é proporcionar uma composição de xantofila conforme acima definido, em que a composição contém pelo menos 85% em peso de xantofilas totais, das quais pelo menos 80% em peso é trans-luteína, sendo os restantes 15% em peso isómeros de zeaxantina, nomeadamente (R,R)-zeaxantina e (R,S)-zeaxantina, derivados de extrato da planta/oleoresina contendo xantofilas/ésteres de xantofilas, a qual é segura para consumo humano e útil para nutrição e cuidados de saúde.

Ainda um outro objetivo da presente invenção é

proporcionar um processo definido pelas reivindicações para a preparação da composição de xantofila contendo pigmentos maculares constituídos por trans-luteína, isómeros de zeaxantina, nomeadamente (R,R)-zeaxantina e (R,S)-zeaxantina, derivados do extrato/oleoresina de planta contendo xantofilas/ésteres de xantofilas, a qual é segura para consumo humano e útil para nutrição e cuidados de saúde.

Os objetivos acima mencionados foram atingidos através da presente invenção com base nas nossas descobertas seguintes:

a) A etapa de saponificação para converter os ésteres de xantofila presentes no extrato/oleoresina de planta na forma desesterificada pode ser combinada com a isomerização limitada da luteína para se produzir a composição de xantofila contendo uma quantidade superior de trans-luteína, sendo o restante isómeros de zeaxantina, nomeadamente (R,R)-zeaxantina e (R,S)-zeaxantina e vestígios de outros carotenóides derivados do extrato/oleoresina de planta contendo xantofilas/ésteres de xantofilas, a qual é segura para consumo humano e útil para nutrição e cuidados de saúde.

b) na etapa de saponificação, pode-se dissolver hidróxido de potássio ou hidróxido de sódio em 1-propanol sem a adição de água.

c) a temperatura da saponificação/isomerização

pode ser entre 70 e 100 °C, de preferência à volta de 95 graus e o período de saponificação pode ser 1-2 horas, e

d) o acetato de etilo empregue no processo pode ser recuperado e utilizado, se requerido, tornando o processo económico.

• **Sumário da Invenção:**

Por conseguinte, a presente invenção proporciona uma composição de xantofila contendo pigmentos maculares constituídos por trans-luteína, isómeros de zeaxantina, nomeadamente (R,R)-zeaxantina e (R,S)-zeaxantina, derivados do extrato/oleoresina de planta contendo xantofilas/ésteres de xantofilas, a qual é segura para consumo humano e útil para nutrição e cuidados de saúde, a qual compreende pelo menos 80% em peso de xantofilas totais, das quais a razão entre trans-luteína e isómeros de zeaxantina está na gama de 4:1 a 6:1 e estando a razão dos isómeros de zeaxantina na gama de 80 para 20:20 para 80. Nalgumas concretizações, a razão entre trans-luteína e isómeros de zeaxantina é de cerca de 5:1.

De acordo com uma outra concretização da presente invenção, é proporcionada uma composição de xantofila em que a composição contém pelo menos 85% em peso de xantofilas totais, das quais o teor de trans-luteína é pelo menos 85% e estando a razão entre a trans-luteína e os isómeros de zeaxantina na gama de 4:1 a 6:1 e estando a

razão dos isómeros de zeaxantina na gama de 80 para 20:20 para 80.

De acordo com ainda outra concretização da presente invenção, é proporcionada uma composição de xantofila conforme acima definido, em que a composição contém pelo menos 85% em peso de xantofilas totais, das quais pelo menos 80% em peso é trans-luteína, sendo os 15% em peso restantes isómeros de zeaxantina, nomeadamente (R,R)-zeaxantina e (R,S)-zeaxantina.

De acordo com outra concretização da presente invenção, é proporcionado um processo para a preparação de uma composição de xantofila contendo pigmentos maculares constituídos por trans-luteína, isómeros de zeaxantina, nomeadamente (R,R)-zeaxantina e (R,S)-zeaxantina, derivados do extrato/oleoresina de planta contendo xantofilas/ésteres de xantofilas, a qual é segura para consumo humano e útil para nutrição e cuidados de saúde, que compreende:

(a) saponificação e isomerização parcial simultâneas dos ésteres de xantofila presentes no extrato/oleoresina de planta contendo ésteres de xantofila por mistura do extrato/oleoresina com solução alcalina de 1-propanol, estando a razão de álcali para 1-propanol na gama de 1:0,5 a 1:1 em peso/volume, aquecimento da massa resultante a uma temperatura na gama de 70-100 °C, de preferência 95 °C, durante um período na gama de 1 a 5 horas para se obter um concentrado bruto saponificado/isomerizado;

(b) mistura do concentrado bruto saponificado/isomerizado resultante obtido na etapa (a) com água, estando a razão entre o concentrado e a água na gama de 1:2 até 1:3 em volume/volume, para se formar uma mistura oleosa diluída;

(c) extração da mistura oleosa diluída obtida na etapa (b) com acetato de etilo, estando a razão entre a mistura oleosa diluída e o acetato de etilo na gama de 1:1,5 até 1:2 volume/volume, para se obter um extrato contendo a composição de xantofila;

(d) evaporação da composição obtida na etapa (c) para se remover o acetato de etilo;

(e) purificação da composição resultante da etapa (d), lavando-se primeiro com solvente não polar e depois com solvente polar, e filtração;

(f) secagem da composição resultante sob vácuo a uma temperatura na gama de 40 a 45 °C durante um período que varia de 48-72 horas;

(g) se desejado, recuperação do acetato de etilo utilizado na etapa (c) através de métodos convencionais e, se requerido, reutilizado e

(h) armazenamento da composição resultante numa atmosfera inerte a - 20 °C.

Através do ajuste da temperatura, do tempo e da quantidade de álcali na etapa (a), das razões nas etapas (b) e (c), pode ser obtida a composição desejada da presente invenção.

Deve ser notado que a invenção almeja o uso de vegetais de folhas e verdes, milho frutos e calêndulas como a fonte para a oleoresina de xantofilas. Mas considerando que a luteína está presente juntamente com zeaxantina na forma livre associada com grandes quantidades de clorofila e outros carotenóides indesejáveis na maioria das frutas, e pese embora de acordo com a presente invenção o uso de vegetais de folhas e verdes, milho, e frutos é possível, e considerando a baixa concentração de luteína e zeaxantina nos materiais anteriores, e ainda que as etapas elaboradas de purificação que sendo requeridas não são económicas, a calêndula é o material de partida preferido para a preparação da composição da presente invenção.

Especificamente, a oleoresina de calêndula de qualidade alimentar comercialmente disponível, produzida por extração com hexano, pode ser usada como material de partida (Kumar et al., Process for the Preparation of Xanthophylls Crystals, Patente dos EUA No. 6.743.953, 2004; Kumar, Patente dos EUA No. 6.737.535, 2004) para a preparação da composição de xantofila compreendendo trans-luteína e isómeros de zeaxantina.

A flor de calêndula (*Tagetes erecta*) é considerada a melhor fonte comercial possível de trans-luteína uma vez que contém mono e diésteres de luteína como constituintes principais de carotenóides. O extrato/oleoresina de calêndula obtido a partir de farinha de flor seca contém cerca de 20-40% de ésteres de luteína, dependendo da variedade cultivada e do processo de extração. Além de luteína, a calêndula contém também 5% de (R,R)-zeaxantina e vestígios de alfa- e beta-criptoxantina e beta-caroteno (Khachik, Patente dos EUA 5.382.714, 1995).

O álcali utilizado na etapa (a) pode ser selecionado de hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio.

O solvente não polar utilizado na etapa (d) pode ser um solvente hidrocarboneto, o qual pode ser selecionado de pentano, hexano e heptano, preferencialmente hexano. O solvente polar utilizado na etapa (e) pode ser selecionado de um álcool alifático inferior.

A atmosfera inerte usada para armazenamento da composição resultante pode ser um gás inerte como azoto.

- **Descrição detalhada do processo**

Na presente invenção, o extrato contendo éster de xantofila é misturado com 1-propanol no qual o álcali está já dissolvido. A razão de álcali para 1-propanol e para o extrato de planta é 0,5-1:0,5-1,0 e 1,0 respetivamente. A

mistura é aquecida até uma temperatura de 90 °C e mantida durante 1-5 horas, sob agitação. As xantofilas totais na mistura reacional são determinadas por análise Espectrofotométrica (AOAC - 16th Edition Method 970.64), enquanto a análise por HPLC da mesma proporciona a percentagem de trans-luteína e zeaxantina (Hadden et al., J. Agric. Food. Chem., 47, 4189-494, 1999).

A saponificação do extrato/oleoresina resulta na libertação de xantofilas na forma livre, juntamente com sais alcalinos de ácidos gordos. A reação de isomerização converte parte da luteína de calêndula em (R,S)-zeaxantina. A isomerização de luteína em isómeros de zeaxantina pode ser variada por mudança dos parâmetros do processo, tais como a razão álcali:solvente, temperatura e duração. A composição das xantofilas na mistura reacional é analisada por extração em hexano:acetona:etanol:tolueno (10:7:6:7 v/v), seguida pela adição de hexano e de solução de sulfato de sódio a 10% e analisando-se a camada superior por HPLC.

Após a obtenção do grau desejado de isomerização e da composição de xantofilas com teor de trans-luteína tipicamente por volta dos 85%, a mistura reacional é diluída com água e bem agitada à temperatura ambiente para se obter uma camada oleosa amarela contendo xantofilas na forma livre associadas com o ácido gordo, sabões e impurezas.

Após se transferir esta camada oleosa para um

funil de separação, adiciona-se acetato de etilo e extraem-se as xantofilas. Lava-se a camada de acetato de etilo duas vezes com um volume igual de água desionizada. Assim, os ácidos gordos e os materiais saponosos são removidos para a água que é em seguida descartada. Concentra-se o extrato de acetato de etilo por destilação do solvente sob pressão reduzida para se recuperar o acetato de etilo e o concentrado de xantofila bruto.

Submete-se a composição de concentrado de xantofila a purificação por agitação com hexano à temperatura ambiente durante uma hora, seguida por filtração. Lava-se ainda a massa de xantofila com etanol e secam-se os cristais cor de laranja resultantes sob vácuo, à temperatura ambiente durante 72 horas.

A composição do produto de xantofila purificado mostra ser constituída por aproximadamente 80 a 90% de xantofilas totais em peso, por análise espectralométrica, e a composição dos carotenóides das xantofilas 80 a 85% de trans-luteína e tipicamente cerca de 15 a 20% de isómeros de zeaxantina, e por vezes teores tão baixos como cerca de 11,5%, por análise de HPLC com coluna Cosmosil 5 SL-11, 250 4,61 i.d. 5 m, Nacali Tesque co. Ltd. Quioto, Japão, com acetona:n-hexano (1:9) a um caudal de 1 mL/min, utilizando-se uma bomba Hitachi L 6200 e um detetor UV-Vis L-4250 a 450 nm. A HPLC quiral foi realizada para a separação e quantificação de (R,R)-zeaxantina e (R,S)-zeaxantina (coletivamente aqui referidas como isómeros de zeaxantina), usando-se Sumichiral OA-2000.

A composição da presente invenção contém pelo menos 80% em peso de luteína, a qual é derivada de extra-
to/oleoresina de planta contendo xantofilas/ésteres de xan-
tofilas e a sua segurança está bem estabelecida (Kuzhuvelil
Bhaskarannair Harikumar et al., Toxicity Profile of Lutein
and Lutein Ester Isolated From Marigold Flowers (*Tagetes
erecta*), International Journal of Toxicology, Vol. 27, No.
1, 1-9 (2008)). A composição remanescente é constituída por
(R,R)-zeaxantina, a qual é extraída juntamente com a
luteína e a sua segurança é estabelecida juntamente com a
da luteína no estudo acima. O resto da composição compre-
ende isómero (R,S) de zeaxantina, que é também formado a
partir de luteína. Além disso, o processo para preparação
da composição da presente invenção é levado a cabo sob
condições cGMP (current Good Manufacturing Practice -
prática atual para a manufatura de bens). O processo é
realizado seguindo as diretrizes ISO 22000 e sendo a
segurança alimentar monitorizada através de HACCP (Hazard
Analysis and Critical Control Points - Análise de Perigos e
Pontos Críticos de Controle), conforme descrito abaixo.

Portanto, a composição da presente invenção
satisfaz todos os requisitos de segurança e pode ser
considerada segura para consumo humano. Conforme explicado
nos parágrafos anteriores, o isómero (R,S) de zeaxantina
está presente na mácula e é formado pela ação de enzimas no
corpo na luteína.

Portanto, a composição da presente invenção compreendendo trans-luteína, (R,R)-zeaxantina e (R,S)-zeaxantina é segura para consumo humano.

Os detalhes da invenção são dados nos exemplos seguintes, que são fornecidos para ilustrarem a invenção e por conseguinte não devem ser considerados como limitativos do âmbito da presente invenção.

Exemplo 1:

Misturou-se oleoresina de calêndula (100,3 g) contendo 135,40 g/kg de xantofila (pelo método espectrofotométrico) com 50 g de hidróxido de potássio dissolvido em 50 ml de 1-propanol. Aqueceu-se a mistura reacional e manteve-se a 95 °C durante um período de 2 horas. Durante a fase de reação tomou-se a amostra para análise do teor de trans-luteína e zeaxantina utilizando-se HPLC. Agitou-se a massa reacional com 500 ml de água destilada à temperatura ambiente. Retirou-se a mistura para uma funil de separação e extraíu-se com igual volume de acetato de etilo. Este exercício foi feito 5 vezes. Recuperou-se a camada de acetato de etilo e lavou-se com água destilada para se remover o excesso de álcali, materiais saponosos, e outras impurezas solúveis em água. Destilou-se a camada de acetato de etilo sob pressão reduzida para se obterem 72,10 g de extrato bruto saponificado.

Este extrato bruto (72 g), obtido conforme acima

descrito, foi submetido a purificação por agitação com 360 ml de hexano à temperatura ambiente durante 1 hora, seguida de filtração. Obtiveram-se 26,20 g de um precipitado húmido, o qual foi lavado com 262 ml de etanol à temperatura ambiente durante 1 h, seguido por filtração. Secaram-se os cristais cor de laranja resultantes sob vácuo, à temperatura ambiente, durante 72 horas, e armazenaram-se sob atmosfera de azoto.

O rendimento da composição de xantofila foi de 10,40 g, tendo um teor de xantofila de 83,29% em peso (conforme determinado por espectrofotometria UV/Vis). A composição do produto era 80,80% de trans-luteína e 19,2% de isómeros de zeaxantina determinada por análise por HPLC. A análise quiral por HPLC (Coluna Sumichiral OA-2000; solvente n-hexano:clorofórmio (48:8) mostrou 46,3% de (R,R)-zeaxantina e 53,7% de (R,S)-zeaxantina.

Exemplo 2:

Misturou-se oleoresina de calêndula (50 g) contendo um teor de xantofila de 124,10 g/kg (pelo método espectrofotométrico) com 25 g de hidróxido de potássio dissolvido em 25 ml de 1-propanol. Aqueceu-se a mistura reacional e manteve-se a 95 °C durante um período de 1 h. Durante a etapa de reação, retirou-se a amostra para análise do teor de trans-luteína e zeaxantina, utilizando-se HPLC. Agitou-se a massa reacional obtida com 250 ml de água destilada à temperatura ambiente. Retirou-se a mistura

para um funil de separação e extraíu-se com igual volume de acetato de etilo. Este exercício foi repetido 5 vezes. Recuperou-se a camada de acetato de etilo e lavou-se com água destilada para se remover o excesso de álcali, de materiais saponosos, e outras impurezas solúveis em água. Destilou-se a camada de acetato de etilo sob pressão reduzida para se obterem 30 g de extrato bruto saponificado.

Este extrato bruto (30 g) foi submetido a purificação por agitação com 150 ml de hexano à temperatura ambiente, durante 1 hora, seguida por filtração. Obtiveram-se 9 g do precipitado, o qual foi lavado com 90 ml de etanol à temperatura ambiente, durante 1 h, seguida por filtração. Secaram-se os cristais cor de laranja resultantes sob vácuo, à temperatura ambiente, durante 72 horas, e armazenaram-se em atmosfera de azoto.

O rendimento da composição de xantofila foi de 4,30 g, tendo um teor de xantofila de 82,59%, em peso (conforme determinado por espectrofotometria UV/Vis). A composição do produto foi de 83,32% de trans-luteína e 15,32% de isómeros de zeaxantina, determinada por análise por HPLC.

Exemplo 3:

Misturou-se oleoresina de calêndula (50 g) contendo um teor de xantofila de 160,07 g/kg (pelo método

espectrofotométrico) com 25 g de hidróxido de potássio dissolvido em 25 ml de 1-propanol. Aqueceu-se a mistura reacional e manteve-se a 95 °C durante um período de 2 h. Durante a etapa reacional retirou-se a amostra para análise do teor de trans-luteína e zeaxantina usando-se HPLC. Agitou-se a massa reacional obtida com 250 ml de água destilada à temperatura ambiente. Retirou-se a mistura para um funil de separação e extraíu-se com igual volume de acetato de etilo. Este exercício foi repetido 5 vezes. Recuperou-se a camada de acetato de etilo e lavou-se com água destilada para se remover o excesso de álcali, materiais saponosos e outras impurezas solúveis em água. Destilou-se a camada de acetato de etilo sob pressão reduzida para se obterem 36 g de extrato bruto saponificado.

Submeteu-se o extrato bruto resultante (36,90 g) a purificação por agitação com 185 ml de hexano à temperatura ambiente, durante 1 hora, seguida por filtração. Obtiveram-se 10,33 g do precipitado, o qual foi lavado com 103 ml de etanol à temperatura ambiente, durante 1 h, seguido por filtração. Secaram-se os cristais cor de laranja resultantes sob vácuo à temperatura ambiente durante 72 horas e armazenaram-se em atmosfera de azoto.

O rendimento da composição de xantofila foi de 7,02 g com um teor em xantofila de 85,59% em peso (conforme determinado por espectrofotometria UV/Vis). A composição do produto foi de 86,50% em trans-luteína e 13,2% em isómeros de zeaxantina, determinada por análise por HPLC.

Exemplo 4:

Misturou-se oleoresina de calêndula (52 g) contendo um teor de xantofila de 132,2 g/kg (pelo método espectralométrico) com 26 g de hidróxido de potássio dissolvido em 26 ml de 1-propanol. Aqueceu-se a mistura reacional e manteve-se a 95 °C durante um período de 1 h. Durante a etapa de reação retirou-se a amostra para análise do teor de trans-luteína e zeaxantina utilizando-se HPLC. Agitou-se a massa reacional obtida com 250 ml de água destilada à temperatura ambiente. Retirou-se a mistura para um funil de separação e extraíu-se com igual volume de acetato de etilo. Este exercício foi repetido 5 vezes. Recuperou-se a camada de acetato de etilo e lavou-se com água destilada para se remover o excesso de álcali, materiais saponosos e outras impurezas solúveis em água. Destilou-se a camada de acetato de etilo sob pressão reduzida para se obterem 30,30 g de extrato bruto saponificado.

Submeteu-se o extrato bruto resultante (30,30 g) a purificação por agitação com 150 ml de hexano à temperatura ambiente durante 1 hora, seguida por filtração. Lavou-se o precipitado obtido (8,00 g) com 80 ml de etanol à temperatura ambiente durante 1 hora, seguido por filtração. Secaram-se os cristais cor de laranja resultantes sob vácuo, à temperatura ambiente, durante 72 horas, e armazenaram-se em atmosfera de azoto.

O rendimento da composição de xantofila foi de 4,40 g com um teor em xantofila de 81,50% em peso (conforme determinado por espectrofotometria UV/Vis). A composição do produto foi de 86,64% de trans-luteína e 11,49% de isómeros de zeaxantina e quantidades vestigiais de outros carotenóides, conforme determinado por HPLC.

• **Vantagens da invenção**

A composição de xantofila contém

(a) pigmentos maculares tais como trans-luteína, (R,R)-zeaxantina e (R,S)-zeaxantina numa proporção específica.

(b) pelo menos 80% de xantofilas totais, das quais a trans-luteína é pelo menos 80% e uma porção remanescente de cerca de 15-20% sendo tipicamente isómeros de zeaxantina, respetivamente (R,R)-zeaxantina e (R,S)-zeaxantina.

2. A composição de xantofila satisfaz as considerações regulamentares de segurança devido ao uso de reagentes GRAS e, portanto, é segura para consumo humano e útil para nutrição e cuidados de saúde.

3. A composição de xantofila é uma fonte de suplemento alimentar contendo todos os pigmentos maculares essenciais que podem ajudar na manutenção da saúde ocular.

4. Muitos formuladores necessitam hoje em dia de formas de ingrediente ativo em que a razão luteína:isómeros de zeaxantina é superior a 20:1, o que é típico para a maioria dos produtos de Extrato de Calêndula. Por forma a se aumentar a razão de zeaxantina nos seus produtos acabados, têm de ser incorporadas fontes suplementares de zeaxantina para além da fonte de luteína. Na presente invenção todas as três xantofilas estão presentes e, por conseguinte, não há nenhuma exigência de adição de quaisquer fontes suplementares.

5. Similarmente, alguns formuladores procuram todas as três formas de carotenóides maculares, ou seja, todos os 3 pigmentos que desempenham um papel protetor macular da retina (nomeadamente, luteína, (R,R)-zeaxantina, (R,S)-zeaxantina). Atualmente é difícil obter todos os três carotenóides a partir de uma fonte e, portanto, os formuladores necessitam frequentemente de utilizar 3 ingredientes diferentes para se fazer uma formulação equilibrada com todos os três pigmentos maculares. É desejável ter uma composição compreendendo trans-luteína e os dois isómeros de zeaxantina, (R,R)-zeaxantina e (R,S)-zeaxantina. No entanto, os formuladores têm tido necessidade de utilizar vários ingredientes de mais de uma fonte para obterem as três xantofilas desejadas. A presente formulação ultrapassa esta desvantagem.

6. Alguns formuladores procuram ingredientes onde

a luteína:isómeros de zeaxantina estejam na razão de 5:1 (em que, adicionalmente, (R,R)-zeaxantina e (R,S)-zeaxantina estejam na razão 1:1) para igualarem a razão de luteína:isómeros de zeaxantina no pigmento macular.

7. O estudo **AREDS II** (Estudo de doenças oculares relacionadas com a idade) realizado com 4000 indivíduos avaliou os efeitos de suplementação oral de doses elevadas de xantofilas maculares (ou seja, luteína e zeaxantina) incluírem a dose de luteína:zeaxantina no suplemento na razão 5:1 (10 mg de luteína:2 mg de zeaxantina). Ref: https://web.emmes.com/study/areds2/resources/areds2_mop.pdf. Espera-se que um único ingrediente que possa proporcionar luteína e zeaxantina na razão de 5:1 possa ser de grande benefício para os formuladores, que aguardam ansiosamente o resultado do ensaio **AREDS II**. Atualmente, este objetivo é alcançado pelo uso de múltiplos ingredientes que aumentam os custos, o esforço e o manuseamento de múltiplos itens de *stock*.

8. A composição de xantofila permitiria o desenvolvimento de uma composição padronizada com a razão requerida de luteína:zeaxantina ou luteína:(R,R)-zeaxantina:(R,S)-zeaxantina a partir de uma única fonte.

Lisboa, 27 de maio de 2016

REIVINDICAÇÕES

1. Uma composição de xantofila contendo pigmentos maculares constituídos por trans-luteína e isómeros de zeaxantina, nomeadamente (R,R)-zeaxantina e (R,S)-zeaxantina, derivados do extrato/oleoresina de planta contendo xantofilas/ésteres de xantofilas, a qual é segura para consumo humano e útil para nutrição e cuidados de saúde que compreende, pelo menos, 80% em peso de xantofilas totais, das quais a razão entre trans-luteína e isómeros de zeaxantina está na gama de 4:1 a 6:1 e a razão dos isómeros de zeaxantina está na gama de 80 para 20:20 para 80.

2. Uma composição de xantofila como reivindicado na reivindicação 1, em que a composição contém pelo menos 85% em peso de xantofilas totais, das quais o teor em trans-luteína é pelo menos 85%.

3. Uma composição de xantofila como reivindicado na reivindicação 1, em que a composição contém pelo menos 85% em peso de xantofilas totais, das quais pelo menos 80% em peso é trans-luteína, sendo os restantes 15% em peso isómeros de zeaxantina, nomeadamente (R,R)-zeaxantina e (R,S)-zeaxantina.

4. O processo para a preparação de uma composição de xantofila contendo pigmentos maculares constituídos por trans-luteína, isómeros de zeaxantina, nomeadamente (R,R)-zeaxantina e (R,S)-zeaxantina, derivados do extra-

to/oleoresina de planta contendo xantofilas/ésteres de xantofilas, a qual é segura para consumo humano e útil para nutrição e cuidados de saúde, que compreende:

(a) saponificação e isomerização parcial simultâneas dos ésteres de xantofila presentes no extrato/oleoresina de planta contendo ésteres de xantofila por mistura do extrato/oleoresina com solução alcalina de 1-propanol, estando a razão de álcali para 1-propanol na gama de 1:0,5 a 1:1 em peso/volume, aquecimento da massa resultante a uma temperatura na gama de 70-100 °C, de preferência 95°C, durante um período na gama de 1 a 5 horas para se obter um concentrado bruto saponificado/isomerizado.

(b) mistura do concentrado bruto saponificado/isomerizado resultante obtido na etapa (a) com água, estando a razão entre o concentrado e a água na gama de 1:2 até 1:3 em volume/volume, para se formar uma mistura oleosa diluída;

(c) extração da mistura oleosa diluída obtida na etapa (b) com acetato de etilo, estando a razão entre a mistura oleosa diluída e o acetato de etilo na gama de 1:1,5 até 1:2 volume/volume, para se obter um extrato contendo a composição de xantofila;

(d) evaporação da composição obtida na etapa (c) para se remover o acetato de etilo;

(e) purificação da composição resultante da etapa (d), lavando-se primeiro com solvente não polar e depois com solvente polar, e filtração;

(f) secagem da composição resultante sob vácuo a uma temperatura na gama de 40 a 45 °C durante um período que varia de 48-72 horas;

(g) se desejado, recuperação do acetato de etilo utilizado na etapa (c) através de métodos convencionais e, se requerido, reutilizado e

(h) armazenamento da composição resultante numa atmosfera inerte a - 20°C.

5. Um processo como reivindicado na reivindicação 4, em que o extrato/oleoresina de planta contendo ésteres de xantofila utilizado é derivado de flores de calêndula.

6. Um processo como reivindicado nas reivindicações 4 e 5, em que o solvente não polar utilizado na etapa (e) é selecionado de um solvente hidrocarboneto, o qual é selecionado de pentano, hexano e heptano, de preferência hexano, e o solvente polar utilizado é selecionado de um álcool alifático inferior.

Lisboa, 27 de maio de 2016

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- * US 63294322001 A
- * US 6379432 B
- * US 67439642004 A
- * US 20070265351 A, Kumar
- * US 72678302007 A
- * US 6743963 B
- * US 59732111999 A
- * US 1567043702006 A
- * US 67439532004 A
- * US 67375352004 A, Kumar
- * US 53827141995 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- * J. T. LANDRUM ; R. A. BONE. Lutein, Zeaxanthin and the Macular Pigment. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2001, vol. 385, 28-40
- * Analysis of Zeaxanthin Distribution within Individual Human Retinas. LANDRUM et al. *Methods in Enzymology*. Academic Press, 1992, vol. 213A, 457-467
- * Measurements of Carotenoids in Human and Monkey Retinas. HANDELMAN et al. *Methods in Enzymology*. Academic Press, 1992, vol. 213A, 220-230
- * BILLSTEN et al. Photophysical Properties of Xanthophylls in Carotene Proteins from Human Retina. *Photochemistry and Photobiology*, 2003, vol. 78, 138-145
- * J. T. LANDRUM ; R. A. BONE. Lutein, Zeaxanthin and The Macular Pigment. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2001, vol. 385, 28-40
- * KHACHIK et al. Identification of Lutein and Zeaxanthin Oxidation Products in Human and Monkey Retinas. *Invest. Ophthalmol. and Vis. Sci.*, 1997, vol. 38, 1802-1811
- * BILLSTEN et al. Photophysical Properties of Xanthophylls in Carotene proteins from Human Retina. *Photochemistry and Photobiology*, 2003, vol. 78, 138-145
- * LANDRUM et al. Dietary Lutein Supplementation Increases Macular Pigment. *FASEB. J.* 1996, vol. 10, A242
- * LANDRUM ; BONE. *Functional Foods and Nutraceuticals*. 01 September 2001
- * BREITHAUPT et al. Comparison of Plasma Responses in Human subjects after the ingestion of (3R,3'R)-zeaxanthin Dipalmitate from Wolfberry (*Lycium barbarum*) and Non-esterified (3R,3'R)-zeaxanthin using Chiral HPLC. *Brit. J. Nutr.*, 2004, vol. 91, 707-713
- * BONE. Lutein and Zeaxanthin Dietary Supplements Raise Macular Pigment Density and Serum Concentrations of These Carotenoids in Humans. *J.Nutr.*, 2003, vol. 133, 992-999
- * KHACHIK et al. Isolation and Structure Elucidation of Geometric isomers of Lutein, Zeaxanthin in Extracts of Human Plasma. *J. Chrom.*, 1982, vol. 582, 153-156
- * chapter on Dietary carotenoids and their metabolites as potentially useful chemo protective agents against cancer. KHACHIK et al. *Antioxidant food supplement in human health*. Academic Press, 1999, 203-29
- * Non-esterified 3R,3'R-zeaxanthin using Chiral HPLC. *Brit. J. Nutr.*, 2004, vol. 91, 707-713
- * LANDRUM ; BONE. Meso-zeaxanthin-A Cutting Edge Carotenoid. *Functional Foods and Nutraceuticals*. 10 September 2001
- * BONE et al. Macular Pigment Response to a Supplement Containing Meso-zeaxanthin. *Nutr. Metabol.*, 2007, vol. 11, 1-9
- * BONE et al. Macular Pigment Response to a Xanthophyll Supplement of Lutein, Zeaxanthin and Meso-zeaxanthin. *Proc. Nutr. Soc.*, 2006, vol. 105A
- * THURNHAM et al. Macular Zeaxanthin and Lutein -a Review of Dietary Sources and Bio-availability and Some Relationship with Macular Pigment Optical Density and Age-related Macular Disease. *Nutr. Res. Reviews*, 2007, vol. 20, 163-179
- * THURNHAM et al. A Supplementation Study in Human Subjects with a Combination of meso-zeaxanthin, (3R,3'R)-Zeaxanthin and (3R,3'R,6'R)-Lutein. *Brit. J. Nutr.*, 2008, vol. 99, 1-8
- * BONE et al. Macular Pigment Response to a Supplement Containing Meso-zeaxanthin, Lutein and Zeaxanthin. *Nutr. Metabol.*, 2007, vol. 11, 1-8

- * BONE et al. Macular Pigment Response to a Xanthophyll Supplement of Lutein, Zeaxanthin and Meso-zeaxanthin. *Proc.Nutr.Soc.*, 2005, vol. 105A
- * THURNHAM et al. A Supplementation Study in Human Subjects with a Combination of Meso-zeaxanthin,(3R,3'R)-zeaxanthin and (3R,3'R,6'R)lutein. *Brit.J.Nutr.*, 2008, vol. 99, 1-8
- * LANDRUM ; BONE. Lutein,Zeaxanthin and the Macular Pigments. *Arch.Biochem.Biophys.*, 2001, vol. 385, 28-40
- * E.Y.CHEW ; SAN GIO VANNI. Lutein in Encyclopedia of Dietary Supplements. Marcel Dekker, 2005, 409-420
- * THURNHAM et al. A Supplementation Study in Human Subjects with a Combination of Meso-Zeaxanthin,(R,R)-zeaxanthin and Lutein. *Brit.J.Nutr.*, 2008, vol. 99, 1-8
- * THURNHAM. Macular Zeaxanthin and Lutein-A Review of Dietary Sources and Bio-availability and Some Relations with MPOD and ARMD. *Nutr.Res.reviews*, 2007, vol. 20, 163-179
- * SCHLATTERER et al. Quantification of (3R,3'R)-zeaxanthin in Plant Derived Food by diastereoisomeric dilution assay applying Chiral HPLC. *J.Chromatography A*, 2006, vol. 1137, 218-222
- * P. KARRER ; E. JUCKER. *Helv. Chim. Acta*, 1947, vol. 30, 266
- * BUCHECKER et al. assigned R-chirality to lutein based on PMR analysis and attempts to isomerize lutein to R,R-zeaxanthin failed. *Chimia*, 1971, vol. 25, 192 [0020]
- * *CHIMIA*, 1972, vol. 26, 134
- * Isomerization of Epsilon-carotene to Beta-carotene and Lutein to Zeaxanthin. *Acta Chem. Scand.*, 1974, vol. B28, 159
- * KRUGER et al. *Food & Chem. Toxicol.*, 2002, vol. 40, 1535-1540
- * PETRA A THÜRMANN ; WOLFGANG SCHALCH ; JEAN-CLAUDE AEBISCHER ; UTE TENTER ; WILLIAM COHN. Plasma kinetics of lutein, zeaxanthin, and 3-dehydro-lutein after multiple oral doses of a lutein supplement. *American Journal of Clinical Nutrition*, July 2005, vol. 82 (1), 88-97
- * NEBELING LC ; FORMAN MR ; GRAUBARD BI ; SNYDER RA. Changes in carotenoid intake in the United States: the 1987 and 1992 National Health Interview Surveys. *J Am Diet Assoc.*, 1997, 991-6
- * LE MARCHAND L ; HANKIN JH ; BACH F et al. An ecological study of diet and lung cancer in the South Pacific. *Int J Cancer*, 1995, vol. 63, 18-23
- * MOHAMEDSHAHF ; DOUGLAS JS ; AMANN MM ; HEMBACH JM. Dietary intakes of lutein + zeaxanthin and total carotenoids among Americans age 50 and above. *FASEB J*, 1999, vol. 13, A564
- * EMILY CHEW ; JOHN PAUL ; SANGIOVANNI. Encyclopedia of Dietary Supplements. Marcel Dekker, 2005, 409-421
- * HADDEN et al. *J.Agric.Food.Chem.*, 1999, vol. 47, 4189-4194
- * KUZHUVELIL BHASKARANNAIR HARIKUMAR et al. Toxicity Profile of Lutein and Lutein Ester Isolated From Marigold Flowers (*Tagetes erecta*). *International Journal of Toxicology*, 2008, vol. 27 (1), 1-9