

(11) Número de Publicação: **PT 1513804 E**

(51) Classificação Internacional:
C07C 403/24 (2007.10) **C09B 61/00** (2007.10)
A23L 1/275 (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2002.11.13**

(30) Prioridade(s): **2002.06.05 IN MA04202002**

(43) Data de publicação do pedido: **2005.03.16**

(45) Data e BPI da concessão: **2009.01.14**
046/2009

(73) Titular(es):

OMNIACTIVE HEALTH TECHNOLOGIES LIMITED
RAJAN HOUSE, APPASAHEB MARATHE MARG
PRABHADEVI, MUMBAI 400025 IN

(72) Inventor(es):

SUNIL KUMAR THATTARUPARAMBILL KRISHNA DAS IN

(74) Mandatário:

ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **NOVO CONCENTRADO DE ÉSTER DE XANTOFILA ENRIQUECIDO COM TRANS-LUTEÍNA E PROCESSO PARA A SUA PREPARAÇÃO**

(57) Resumo:

RESUMO**"NOVO CONCENTRADO DE ÉSTER DE XANTOFILA ENRIQUECIDO COM
TRANS-LUTEÍNA E PROCESSO PARA A SUA PREPARAÇÃO"**

A invenção exposta neste pedido refere-se a um novo concentrado de ésteres de xantofila que compreende predominantemente uma composição que contém ésteres de luteína e de zeaxantina de ácidos gordos em que a composição contém 90-95% de ésteres de trans-luteína, 0-5% de ésteres de cis-luteína e 3,5 até 6% de ésteres de Zeaxantina. A invenção também se refere a um processo para a preparação do concentrado atrás referido que emprega solventes cetónicos. O novo concentrado de ésteres de xantofila enriquecido com trans-luteína da presente invenção é útil para consumo humano, quer como nutracêuticos, suplementos nutricionais, como aditivos alimentares e também para colorir rações para animais. O concentrado possui melhor estabilidade e biodisponibilidade.

DESCRIÇÃO**"NOVO CONCENTRADO DE ÉSTER DE XANTOFILA ENRIQUECIDO COM
TRANS-LUTEÍNA E PROCESSO PARA A SUA PREPARAÇÃO"****Introdução**

A presente invenção refere-se a um novo concentrado de ésteres de xantofila enriquecido com trans-luteína e um processo para a sua preparação. A presente invenção, mais particularmente, fornece um novo concentrado de ésteres de xantofila enriquecido com trans-luteína, em que os ésteres de xantofila compreendem 90-95% de ésteres de trans-luteína, 0,5% de ésteres de cis-luteína e 3,5-6% de ésteres de zeaxantina. O novo concentrado de ésteres de xantofila enriquecido com trans-luteína da presente invenção é útil para consumo humano, quer como nutracêuticos, suplementos nutricionais, como aditivos alimentares e também para colorir rações para animais. Como nutracêuticos, o concentrado da presente invenção possui um uso particular como um agente para protecção contra doenças oftalmológicas devidas ao envelhecimento, catarata e degeneração macular, para redução do risco de manifestação de certas doenças como cancro, doenças cardiovasculares, etc e como um antioxidante. O concentrado da presente invenção possui também melhor estabilidade e biodisponibilidade.

A invenção também fornece um processo para a preparação do atrás referido novo concentrado de ésteres de xantofila enriquecido com trans-luteína a partir de oleorresina, especialmente a partir de oleorresina do malmequer.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO:

Os carotenóides são a espécie de pigmentos mais abundante largamente distribuídos entre plantas e são considerados ser não tóxicos para consumo humano. Os ésteres de xantofila pertencem ao grupo destes carotenóides. Eles são essencialmente di ou monoésteres de ácidos gordos dos carotenóides que consistem principalmente em dipalmitato, dimiristato, diestearato igualmente de luteína e de zeaxantina. O éster de zeaxantina é um pigmento contido em bagas por exemplo essas do género Lycium chinense (Sinforina chinesa) e Physalis. Ésteres de luteína são os pigmentos que fornecem a cor amarelo/vermelho aos frutos por exemplo laranjas, pêssegos, papaias, mangas, etc. Ésteres de luteína estão também presentes em muitas partes florais particularmente nas flores do malmequer do género Tagetes. Os ésteres de xantofila são geralmente encontrados na natureza como isómeros trans de xantofila e também na forma isomérica cis em vestígios formados principalmente devido a condições adversas de calor e luz. Os ésteres de luteína de pureza mais alta e de forma isomérica trans preservada naturalmente são preferidos para uso em requesitos humanos devido à sua melhor estabilidade e biodisponibilidade.

Os carotenóides atrás que são principalmente solúveis em gordura possuem aplicações limitadas em produtos alimentares. Di-hidroxicarotenóides (xantofilas), luteína e zeaxantina são os compostos altamente considerados como corantes para ração de aves domésticas e também um suplemento nutricional para a saúde. Os ésteres de xantofila formam o componente de coloração majoritário nas flores do malmequer e nos seus extractos.

A flor do malmequer é a fonte mais rica de ésteres de trans-luteína encontrada na natureza. As flores do malmequer secas e moídas têm sido usadas comercialmente durante mais de três décadas como um agente de pigmentação em rações de aves domésticas e animais e como agente para colorir produtos alimentares. Desde há muitos anos tem sido usada como o material de partida para a produção de extractos do malmequer que contêm ésteres de xantofila que é um componente comercial importante. Referência a propósito disto pode ser feita à Patente U.S. nº 3.539.686 (1970) e patente Alemã nº 1.224.597.

Recentemente, estes e outros ésteres de carotenóides ambos nas formas de mono e diésteres foram recentemente expostos como ocorrendo naturalmente em vários frutos e legumes (D.E. Breithaupt and A. Bamedi; *Journal of Agricultural Food Chemistry*, Vol. 49, 2064-2070 (2001); F. Khachik, G.R. Beecher and W.R. Lusby, *Journal of Argi. Food Chemistry*, Vol 36, 938-946, 1988). Os ésteres de xantofila

com maiores quantidades de teor em trans-luteína ganharam importância e são preferidos devido à ocorrência natural nos produtos alimentares, melhor estabilidade e biodisponibilidade (Bowen and Clark, patente U.S. nº 6313169, November 2001; Herbst et al. FASEB Journal abstract Nº 11, 2587, (1997); A. Subagio, H. Wakaki and N. Morita, Biosci. Biotechnol. Biochem., 63 (10), 1784-1786, (1999)). Além disso, o poder para colorir no caso da trans-luteína (máxima absorção a 474 nm) é superior ao da cis-luteína (máxima absorção a 468 nm) (W.L. Hadden, R.H. Watkins, L.W. Levy, E. Regalado, D.M. Rivadeneira, R.B. van Breemen and S.J. Schwartz of J. Agricultural Food Chemistry, Vol. 47, 4182-4194 (1999)).

A Patente U.S. nº 4.0482.03, (1977) (Phillip) descreve um processo para a extração de ésteres de luteína começando pelo extracto do malmequer preparado por tratamento das pétalas do malmequer secas e moídas (1 kg) com éter de petróleo à temperatura ambiente. O extracto foi obtido por remoção do solvente sob vácuo a 50°C. A oleoresina (65 g) obtida através deste processo foi dissolvida em isopropanol quente a 75°C e a solução filtrada através de um funil de vidro sinterizado para remover materiais não dissolvidos. O filtrado foi depois arrefecido a 15°C e os ésteres de luteína de ácidos gordos precipitados obtidos por filtração através de funil de vidro sinterizado. Os ésteres foram secos sob vácuo a 30°C para produzir 21 g de ésteres de luteína de ácidos gordos com 51% de teor de ésteres de luteína.

Nesta patente não existe indicação do teor de formas isoméricas trans e/ou cis. É nossa observação que devido a alta temperatura de precipitação com alanol, quantidade considerável de ésteres de trans-luteína é convertida na forma isomérica cis, que é considerada indesejável para uso como suplementos nutricionais em seres humanos. Além disso o tom/cor tintorial da forma isomérica cis é relativamente pobre.

Tycozkowski and Hamilton (Poultry Science, 70, 651-654 (1991))descreveram um processo para a preparação de diésteres de trans-luteína por reacção de luteína livre (Preparada da oleorresina do malmequer depois de saponificação) com um cloreto de acilo. Neste processo o extracto saponificado das pétalas do malmequer que contem 14,70 mg de luteína por grama foi o material de partida. A 1 g do material foi adicionado 10 mL de mistura de solventes HAET (hexano: acetona: tolueno: álcool absoluto na razão de 10:7:7:6 respectivamente). A mistura foi bem agitada seguida pela adição de 10 mL de hexano e depois 7 mL de sulfato de sódio aquoso a 10%. Depois de deixar repousar durante 1 hora, a camada de cima límpida foi separada, condensada sob atmosfera de azoto a um terço do seu volume inicial, e colocada a 4°C até que se tenham formado cristais. Os cristais foram filtrados, lavados com hexano frio, e dissolvidos em uma quantidade mínima de hexano quente: acetona (80:20 v/v) para recristalização. Os cristais finais foram armazenados sob gás azoto no escuro.

Os diésteres de luteína foram preparados por reacção da luteína livre com cloreto de acilo. Em um exemplo, 20 mg de luteína foram dissolvidos em 15 mL de piridina seguidos pela adição de 1 mL de cloreto de palmitoílo (99+%), e a mistura incubada a 50°C durante 2 horas. Mais tarde a mistura de reacção foi transferida para um funil de separação com a adição de 30 mL de solução de HAET e hexano. A mistura foi depois lavada duas vezes com iguais volumes de sulfato de sódio aquoso a 10% (Na_2SO_4) e duas vezes com água destilada. Depois de secar a camada superior com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), o solvente foi evaporado sob gás azoto e o resíduo de diéster de luteína foi armazenado sob gás azoto no escuro a -20°C.

Este método baseado em síntese não é preferido devido à presença de impurezas associadas e não disponibilidade dos diésteres de luteína que ocorrem naturalmente (ésteres de xantofila). Por esse motivo, o produto que resulta do referido método não é equivalente ao produto semelhante produzido ou derivado de fonte natural por exemplo as flores do malmequer ou os seus extractos.

Recentemente, Levy na Patente U.S. n° 6.19.1293; (2001) descreveu um método para a preparação de concentrados de ésteres de trans-xantofila que possuem um teor de ésteres de trans-xantofila pelo menos 4 vezes maior e preferencialmente pelo menos nove vezes maior que o teor de ésteres de cis-xantofila. A patente descreve que os

concentrados de ésteres de xantofila que possuem um teor total de ésteres de xantofila de pelo menos 40% em peso e preferencialmente maior que cerca de 55% em peso são obtidos pelo processo exposto aqui.

O método de preparação compreende pôr em contacto material da planta que contem ésteres de xantofila com um solvente de hidrocarbonetos durante um tempo suficiente para extrair ésteres de xantofila do material da planta, separar o solvente de hidrocarbonetos e o extracto dissolvido nele do restante material da planta, evaporar o solvente de hidrocarbonetos do extracto dissolvido para obter um concentrado de éster de xantofila bruto, adicionar e misturar o concentrado de ésteres de xantofila bruto com um álcool preferencialmente isopropanol a aproximadamente temperatura ambiente para dissolver impurezas de não xantofila e ésters de cis-xantofila do concentrado de trans-xantofilas bruto para obter o concentrado de ésteres de trans-xantofila purificado. Em uma forma de realização preferida da invenção exposta na atrás referida Patente U.S., o material da planta usado é flores dos malmequeres, preferencialmente as corolas das referidas flores.

O método exposto na Patente atrás descreve um exemplo em que um quilograma de corolas secas dos malmequeres (teor de ésteres de luteína 2,90% em peso) produziu 100 g de oleorresina por extracção com 8 litros de hexano. A oleorresina mostrou 27,9% de ésteres de luteína em peso e razão de isómeros 75:25 da trans-: cis-luteína

(pelas alturas dos picos em HPLC). A oleorresina foi agitada durante três horas com 200 g de isopropanol a 20°C e depois de filtração e remoção do solvente produziu 20 g de concentrado de ésteres de luteína com 69% de teor de ésteres de luteína (por método espectrofotométrico) e razão de isômeros trans-:cis-luteína de 90:10 (por método de HPLC).

No método atrás, adicionar e misturar a oleorresina com isopropanol à temperatura ambiente ajuda a dissolução preferencial de isômeros cis em isopropanol e desse modo o concentrado de ésteres de luteína fica enriquecido com teor de ésteres de trans-luteína com uma razão trans-:cis- de 90:10. O método emprega remoção do resíduo de isopropanol por aplicação de vácuo à temperatura ambiente. Uma vez que o isopropanol possui um ponto de ebulição de cerca de 82,5°C, a sua remoção para ir ao encontro dos requisitos de saúde envolve períodos longos de tempo, tornando o processo consumidor em tempo e laborioso.

É agora bem reconhecido que os ésteres de trans-xantofila que contêm maiores quantidades de teor de trans-luteína possuem melhor estabilidade e biodisponibilidade. Além disso, também possuem maior poder de coloração (máxima absorção de ésteres de trans-luteína a 474 nm e ésteres de cis-luteína a 468 nm). Por conseguinte, correntemente existe uma maior procura para concentrado de ésteres de xantofila que possui maiores quantidades de isômero trans e consequentemente a importância comercial desse produto

ganhou importância mundialmente. Por esse motivo, voltámos os nossos esforços de investigação para o desenvolvimento de um concentrado de ésteres de xantofila que possui maiores quantidades de isómero trans e quantidade insignificante ou vestígio de isómero cis, e um processo para a preparação de um tal concentrado.

Por esse motivo, o objectivo principal da presente invenção é fornecer um novo concentrado de ésteres de xantofila que possui maiores quantidades de isómero trans e quantidade insignificante ou vestígio de isómero cis que é útil em consumo humano, quer como nutracêutico, suplementos nutricionais, aditivos alimentares e também para colorir produtos alimentares e rações para animais que possui melhor estabilidade e biodisponibilidade.

Um outro objectivo da presente invenção é fornecer um novo concentrado de éster de trans-xantofila que compreende uma composição que contem ésteres de luteína e zeaxantina de ácidos gordos em que a composição contem 90-95% de ésteres de trans-luteína, 0-5% de ésteres de cis-luteína e 3,5-6% de ésteres de zeaxantina que é útil para consumo humano, quer como nutracêuticos, suplementos nutricionais, como aditivos alimentares e também para colorir produtos alimentares e rações para animais e que possui melhor estabilidade e biodisponibilidade.

Ainda um outro objectivo da presente invenção é fornecer um processo para a preparação de novo concentrado

de ésteres de trans-xantofila que compreende uma composição que contem ésteres de luteína e de zeaxantina de ácidos gordos em que a composição contem 90-95% de ésteres de trans-luteína, 0-5% de ésteres de cis-luteína e 3,5-6% de ésteres de zeaxantina, que possui melhor estabilidade e biodisponibilidade.

Ainda assim um outro objectivo da presente invenção é fornecer um processo para a preparação de novo concentrado de ésteres de trans-xantofila que compreende uma composição que contem ésteres de luteína e de zeaxantina de ácidos gordos em que a composição contem 90-95% de ésteres de trans-luteína, 0-5% de ésteres de cis-luteína e 3,5-6% de ésteres de zeaxantina, que possui melhor estabilidade e biodisponibilidade, da oleorresina por exemplo oleorresina do malmequer.

A invenção tem sido desenvolvida baseada no nosso achado que ao preservar a forma natural isomérica trans no extracto de ésteres de xantofila que compreende uma composição que contem ésteres de luteína e de zeaxantina de ácidos gordos e pela remoção selectiva dos ésteres de cis-luteína e outras impurezas indesejáveis daí, um novo concentrado de ésteres de xantofila que contem predominantemente ésteres de trans-luteína com níveis insignificantes de ésteres de cis-luteína e isento das indesejáveis impurezas pode ser obtido.

Verificámos que ao seguir o método atrás, um novo

concentrado de ésteres de trans-xantofila pode ser obtido, que contem ésteres de luteína e de zeaxantina de ácidos gordos que compreende 90-95% de ésteres de trans-luteína. Esse concentrado possuiria propriedades de pigmentação mais elevadas e maior biodisponibilidade de ésteres de trans-luteína. Conseqüentemente, o novo concentrado seria muito mais útil como nutracêuticos por exemplo esses explicados mais cedo, como suplementos nutricionais humanos e como agente de coloração para produtos alimentares e rações para animais.

Com o objectivo atrás em mente estudámos em profundidade a eficácia de dissolver solutos específicos em solventes específicos. Geralmente, a eficácia de dissolver solutos específicos em solventes específicos é governada pelos parâmetros como polaridade do soluto, parâmetro de solubilidade do solvente, temperatura, pressão, relação de soluto para solvente, tempo de mistura, etc. Observámos que quando os solventes cetónicos alifáticos por exemplo 2-propanona, 2-butanona e 2-pentanona ou as suas misturas são misturados com extractos que contêm ésteres de xantofila, que compreendem uma composição que contem ésteres de luteína e de zeaxantina de ácidos gordos, existe uma dissolução preferencial de ésteres de luteína isomérica cis e das impurezas por exemplo triglicéridos, ceras, etc, no referido solvente, que resulta em um concentrado enriquecido com ésteres de trans-luteína.

Pode ser visto a partir da literatura (J A

Riddick et al., Organic Solvents Tech Organic Chemistry, Vol II, 5th Edition, John Wiley and Sons, 1986) que as cetonas alifáticas como 2-propanona, 2-butanona, 2-pentanona e as suas misturas possuem valores de parâmetros de solubilidade cerca de 10 que é entre os valores dos parâmetros de solubilidade dos solventes não polares [como o hexano é cerca de 7] e solventes polares [como o metanol cerca de 14,5]. A razão para a solubilidade única preferencial e selectiva do isómero cis e as impurezas nos atrás referidos solventes cetónicos pode ser devida às atrás referidas características dos solventes, e também a natureza assimétrica do isómero cis e/ou devido aos efeitos sinérgicos dos atrás referidos fenómenos. A selecção dos atrás mencionados solventes cetónicos, entre a larga gama de solventes cetónicos é baseada em factores críticos como regulamentos na segurança e na saúde, facilidade de manipulação, considerações comerciais de ponto de ebulição baixo e mais importante a atrás referida propriedade funcional de selectividade. É também de ser mencionado aqui que o uso desses solventes cetónicos não tem até este ponto sido usado para a dissolução selectiva dos isómeros cis.

Desta maneira, a presente invenção fornece um novo concentrado de ésteres de xantofila, que é útil para consumo humano, quer como nutracêuticos ou como aditivos alimentares e também para colorir produtos alimentares e rações para animais e que possui melhor estabilidade e biodisponibilidade que compreende predominantemente uma composição que contém ésteres de luteína e de zeaxantina de

ácidos gordos em que a composição contem 90-95% de ésteres de trans-luteína, 0-5% de ésteres de cis-luteína e 3,5-6% de ésteres de zeaxantina.

De acordo com uma outra forma de realização da presente invenção aí é também fornecido um processo para a preparação do atrás definido concentrado de ésteres de xantofila que compreende

(a) Adicionar e misturar um extracto ou oleorresina que contem ésteres de xantofila que contem ésteres de luteína e de zeaxantina de ácidos gordos com um solvente cetónico alifático seleccionado de 2-propanona, 2-butanona e 2-pentanona ou as suas misturas a uma temperatura na gama de 10°C e 30°C sob agitação para selectivamente solubilizar as impurezas dos ésteres de não xantofila e os ésteres de cis-luteína e lípidos presentes ali e simultaneamente enriquecer na mistura resultante o teor dos ésteres de trans-luteína.

(b) Filtrar a mistura resultante para obter concentrado de ésteres de xantofila enriquecido com trans-luteína em uma forma sólida e

(c) Secar o concentrado sob vácuo à temperatura ambiente e

(e) Preservar o concentrado a uma temperatura abaixo de 20°C em uma atmosfera inerte e em recipientes opacos hermeticamente fechados para evitar a degradação do concentrado.

Em uma forma de realização preferida da invenção a relação entre peso e volume do extracto ou oleorresina que contem ésteres de xantofila desde a fonte de plantas até ao solvente cetónico usou gamas desde 1:3 até 1:5. O extracto ou oleorresina preferido que contem ésteres de xantofila que contem ésteres de luteína e de zeaxantina de ácidos gordos usado é oleorresina do malmequer.

A temperatura empregue para adicionar e misturar o extracto com o solvente cetónico pode ser preferencialmente na gama de 15°C e 30°C.

O período de agitação no passo (a) pode ser durante um período que varia desde 2 até 12 horas, preferencialmente cerca de 10 horas.

O concentrado resultante tem que ser preservado convenientemente a temperatura baixa nomeadamente abaixo de 20°C em uma atmosfera inerte e em recipientes opacos hermeticamente fechados para evitar a degradação do concentrado.

O concentrado de ésteres de xantofila enriquecido com trans-luteína da presente invenção pode ser convertido, se desejado, em produtos como microesferas, cápsulas, pílulas, unguentos, cápsulas de gelatina mole, comprimidos, comprimidos mastigáveis, loções/preparações líquidas, etc por métodos convencionais.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

A oleorresina do malmequer de qualidade alimentar produzida comercialmente usando hexano como extracto pode ser usada como o material de partida para o processo da presente invenção. Como foi explicado mais cedo a flor do malmequer (*Tagetes erecta*) é conhecida como sendo a fonte mais rica para obter ésteres de xantofila e os seus derivados e particularmente para os ésteres de trans-luteína. Em anos recentes o cultivo de flores de malmequeres tem aumentado largamente produzindo flores de malmequeres de qualidade em muitas partes do sul da Índia. Existem muitos fabricantes comerciais que produzem oleorresina do malmequer que contem cerca de 20-25% de ésteres de xantofila.

A oleorresina do malmequer comercialmente obtida/processada que contem teor de trans-luteína e cis-luteína de 66% e 25% respectivamente é adicionada e misturada com um solvente cetónico como 2-propanona, 2-butanona ou as suas misturas, preferencialmente 2-propanona sob agitação a temperatura controlada na gama entre 15°C e 30°C, preferencialmente 25°C, de modo a remover as impurezas e assim como para precipitar os ésteres de xantofila enriquecidos com ésteres de trans-luteína, seguida por filtração e lavagem com o mesmo solvente. O material é seco à temperatura ambiente, sob vácuo para obter um concentrado que contem 90-95% de ésteres de trans-luteína, 0-5% de ésteres de cis-luteína e 3,5-6% de ésteres de zeaxantina.

Também observámos que o concentrado resultante enriquecido com trans-luteína melhorou a aparência visual o que é confirmado por valores mais altos de L^* , a^* , b^* medidos em um Colorímetro de Hunter.

Pelo processo de acordo com presente invenção podíamos preparar um concentrado que possui razão de isómeros de trans-: cis-luteína de pelo menos 18:1, e teor de éster de xantofila de 60-80% em peso no concentrado quando comparado com os correspondentes valores expostos que variam desde 4:1 até 9:1 e 41 até 69% em peso respectivamente (Levy patente U.S. nº 6.191.293, (2001)). Podíamos também preparar concentrado de ésteres de trans-xantofila com a eliminação total do isómero cis.

O novo concentrado de ésteres de xantofila da presente invenção vai ser preservado a uma temperatura abaixo de 20°C em uma atmosfera inerte e em recipientes opacos hermeticamente fechados para evitar a degradação do concentrado.

Os pormenores da invenção são dados nos exemplos enunciados adiante que são fornecidos unicamente para ilustrar só a invenção e por esse motivo não devem ser interpretados para limitar o âmbito da presente invenção.

Neste contexto é de ser notado que não existem procedimentos estabelecidos ou recomendados para análise directa do teor total de éster de xantofila e a sua

composição isomérica por exemplo trans e cis em uma dada amostra. Esta dificuldade é devida ao facto que o concentrado de éster é uma mistura de vários ésteres de ácidos gordos da luteína e da zeaxantina, que não são facilmente separados em HPLC. Além disso, padrões puros ou de referência destes ésteres não são disponíveis de fornecedores reputados de produtos químicos.

Por esse motivo a metodologia mais largamente adoptada consiste na hidrólise inicial do concentrado de éster e medição da cor de uma alíquota da solução a 474 nm usando um espectrofotómetro e expressando o mesmo que o teor da xantofila. Deste valor, o teor de éster de xantofila é calculado multiplicando por 2.

Mais tarde uma alíquota da solução da amostra atrás é analisada por HPLC de fase normal para obter área percentual de isómeros trans & cis de luteína e de zeaxantina. A área percentual de cada um dos isómeros corresponde à composição percentual da sua forma de éster no concentrado.

Nos exemplos que se seguem usámos o método atrás para medição do teor de éster de xantofila, teor de ésteres de cis- & trans-luteína. Também levámos em consideração a área percentual relativa entre os isómeros trans & cis pelo método de HPLC descrito atrás para calcular a razão de trans- e cis-luteína enquanto defenindo o novo concentrado da presente invenção.

Exemplo 1

Uma quantidade pesada de oleorresina do malmequer (180 g) com teor de éster de xantofila de 21,80% em peso e que mostra percentagem de área por HPLC de trans-luteína, cis-luteína e zeaxantina de 64,24, 23,46 e 4,16 respectivamente foi transferida para um balão Erlenmeyer (1.000 mL) seguida pela adição de 720 mL de 2-propanona. Isto foi agitado usando um agitador controlado termostaticamente de 15°C até 25°C durante um período de 5-10 horas. Depois de um intervalo de 2 em 2 horas uma amostra foi retirada, filtrada e o material seco precipitado foi analisado para teor de éster e razão trans-:cis- por HPLC. Finalmente quando o grau desejado da pureza foi alcançado a solução que contem o precipitado foi filtrada através de um funil de Buchner e o precipitado foi seco em secador a vácuo à temperatura ambiente.

O rendimento do concentrado resultante foi 18,19 g (Rendimento de 10,10%) e a análise mostrou teor de éster de xantofila de 64,02% em peso, testado por método espectrofotométrico, medição a 474 nm. Este concentrado de éster de xantofila mostrou por percentagem de área por HPLC, 90,38 de trans-luteína, 3,85 de cis-luteína e 4,43 de zeaxantina respectivamente. Em exame visual, este concentrado mostrou uma cor vermelho laranja melhorada quando comparada com o material de partida, que era de cor castanho escuro.

Exemplo 2

157 g de oleorresina do malmequer de qualidade comercial que contem 21,38% de teor de éster de xantofila em peso, e que contem percentagem de área por HPLC de trans-luteína, cis-luteína e zeaxantina de 65,59, 24,61 e 5,08 respectivamente foram transferidos para um balão erlenmeyer (1.000 mL), e agitados com 540 mL de 2-propanona durante um período de 10 horas de 15°C até 25°C. Depois de um intervalo de 2 em 2 horas uma amostra foi retirada, filtrada e o material seco precipitado foi analisado para o teor de éster e razão trans-:cis- por HPLC. Finalmente quando o grau desejado da pureza foi alcançado a solução que contem o precipitado foi filtrada através de um funil de Buchner e o precipitado foi seco em secador a vácuo à temperatura ambiente.

O rendimento do concentrado resultante verificou-se ser 17,2 g (Rendimento de 10,95%) com teor de ésteres de xantofila de 62,60% em peso, testado por método espectrofotométrico, medição a 474 nm. Este concentrado de éster de xantofila mostrou por percentagem de área por análise de HPLC 92,20 de trans-luteína, 2,33 de cis-luteína e 4,40 de zeaxantina respectivamente. Em exame visual, este concentrado mostrou uma cor vermelho laranja melhorada quando comparada com o material de partida, que era de cor castanho escuro.

Exemplo 3

A experiência foi levada a cabo usando 180 g de oleorresina do malmequer de qualidade comercial que contém 22,12% em peso de teor de ésteres de xantofila com percentagem de área por HPLC de trans-luteína, cis-luteína e zeaxantina de 67,05, 22,98 e 4,50 respectivamente, transferidos para um balão Erlenmeyer (100 mL). A isto foram adicionados 720 mL de 2-propanona e a mistura foi agitada durante um período de 10 horas a 15°C. O bolo precipitado foi filtrado e de novo sujeito a purificação adicional pela adição de 350 mL de 2-propanona e continuando a agitação durante um período de 2-3 horas e mantendo a uma temperatura de cerca de 25°C. Finalmente o concentrado obtido depois de filtração e secagem foi verificado ser 17,40 g (Rendimento de 9,67%). O teor de éster de xantofila foi de 70,58%, testado por método espectrofotométrico, medição a 474 nm. Este concentrado de éster de xantofila mostrou percentagem de área de trans-luteína 92,47, de cis-luteína 2,32 e de zeaxantina 4,31 respectivamente por análise de HPLC. Em exame visual, este concentrado mostrou uma cor vermelho laranja melhorada quando comparada com o material de partida que era de cor castanho escuro.

Exemplo 4

100 g de oleorresina do malmequer obtidos de um lote de produção comercial em escala que possui teor de

ésteres de xantofila de 23,10% em peso e que contem % de área por HPLC de trans-luteína 67,23, de cis-luteína 22,08 e de zeaxantina 5,18 foram retirados. Isto foi adicionado e misturado com 2-propanona, e submetido a agitação controlada em um balão Erlenmeyer a uma temperatura entre 15°C e 28°C para remover impurezas assim como precipitar os ésteres de xantofila ricos em trans-luteína. A mistura foi filtrada e lavada. O concentrado foi seco sob vácuo à temperatura ambiente.

O rendimento do concentrado foi 14,10 g (Rendimento de 14,10%), o teor de ésteres de xantofila foi de 61,18% em peso, testado por método espectrofotométrico, medição a 474 nm. Este concentrado de éster de xantofila mostrou percentagem de área por HPLC de trans-luteína 93,50, de cis-luteína 1,56 e de zeaxantina 4,17 respectivamente.

O produto resultante foi sujeito a purificação adicional por tratamento com 150 mL (duas vezes) do mesmo solvente cetónico nomeadamente 2-propanona e gitação durante um período de 5-10 horas, a uma temperatura de 15°C até 25°C. A mistura resultante foi filtrada e seca sob vácuo. O rendimento foi 9,65 g (9,65%), e o teor de ésteres de xantofila foi de 66,32% em peso, testado por método espectrofotométrico, medição a 474 nm. Este concentrado de ésteres de xantofila mostrou percentagem de área por HPLC, de trans-luteína 94,57, de cis-luteína zero e de zeaxantina 4,45 respectivamente. Em exame visual, este concentrado

mostrou uma cor vermelho laranja melhorada quando comparada com o material de partida, que era de cor castanho escuro.

Exemplo 5

Uma quantidade pesada de oleorresina do malmequer (102 g) com teor de éster de xantofila de 23,06% e percentagem de área de trans-luteína, de cis-luteína e de zeaxantina por HPLC de 68,14, de 20,77 e de 5,18 respectivamente. Esta oleorresina foi transferida para um balão Erlenmeyer (1.000 mL) seguida pela adição de 720 mL de 2-propanona. Isto foi agitado usando um agitador controlado termostaticamente de 15°C até 25°C durante um período de 5-10 horas. Depois de um intervalo de 2 em 2 horas uma amostra foi retirada, filtrada e o material seco precipitado foi analisado para o teor de éster e razão trans-:cis- por HPLC. Finalmente quando o grau desejado da pureza foi alcançado a solução que contem o precipitado foi filtrada através de um funil de Buchner e o precipitado foi seco em secador a vácuo à temperatura ambiente.

O rendimento do concentrado resultante foi 14,77 g (14,48%) e a análise mostrou teor de éster de xantofila de 61,60% testado por método de espectrofotómetro, medição a 474 nm. Este concentrado de ésteres de xantofila continha percentagem de área por HPLC, de trans-luteína 92,03, de cis-luteína 1,95 e de zeaxantina 5,34 respectivamente. Em exame visual, este concentrado mostrou uma cor vermelho laranja melhorada quando comparada com o material de partida, que é de cor castanho escuro.

Exemplo 6

Uma quantidade pesada de oleorresina do malmequer (150,3 g) com teor de éster de xantofila de 23,10% e percentagem de área de trans-luteína, de cis-luteína e de zeaxantina por HPLC de 67,23, 22,08 e 5,18 respectivamente foi transferida para um balão Erlenmeyer (1.000 mL) seguida pela adição de 750 mL de 2-propanona. Isto foi agitado usando um agitador controlado termostaticamente de 15°C até 25°C durante um período de 5-10 horas. Depois de um intervalo de 2 em 2 horas uma amostra foi retirada, filtrada e o material seco precipitado foi analisado para o teor de éster e razão trans-:cis- por HPLC. Finalmente quando o grau desejado da pureza foi alcançado a solução que contem o precipitado foi filtrada através de um funil de Buchner e o precipitado foi seco em secador a vácuo à temperatura ambiente.

O rendimento do concentrado resultante foi 20,10 g (13,37 %) e a análise mostrou teor de éster de xantofila de 59,26% testado por método espectrofotométrico, medição a 474 nm. Este concentrado de ésteres de xantofila continha percentagem de área por HPLC, de trans-luteína 92,71, de cis-luteína 1,40 e de zeaxantina 5,11 respectivamente. Em exame visual, este concentrado mostrou uma cor vermelho laranja melhorada quando comparada com o material de partida, que é de cor castanho escuro.

Exemplo 7

Uma quantidade pesada de oleorresina do malmequer (30,80 g) com teor de éster de xantofila de 23,10% e percentagem de área de trans-luteína, de cis-luteína e de zeaxantina por HPLC de 67,23, 22,08 e 5,18 respectivamente foi transferida para um balão Erlenmeyer (500 mL) seguida pela adição de 125 mL de 2-butanona. Esta mistura foi agitada usando um agitador controlado termostaticamente de 15°C até 25°C durante um período de 10 horas. Depois de um intervalo de 2 em 2 horas uma amostra foi retirada, filtrada e o material seco precipitado foi analisado para o teor de éster por método espectrofotométrico e razão trans:cis- por HPLC. Finalmente quando o grau desejado da pureza foi alcançado a solução que contem o precipitado foi filtrada através de um funil de Buchner e o precipitado foi seco em secador a vácuo à temperatura ambiente.

O rendimento do concentrado resultante foi 3,12 g (10,13% de rendimento) e a análise mostrou teor de éster de xantofila de 46,98% em peso, testado por método espectrofotométrico, medição a 474 nm. Este concentrado de éster de xantofila mostrou percentagem de área por HPLC, de trans-luteína 92,33, de cis-luteína 3,09 e de zeaxantina 3,72 respectivamente. Em exame visual, este concentrado mostrou uma cor vermelho laranja melhorada quando comparada com o material de partida que era de cor castanho escuro.

Exemplo 8

Uma quantidade pesada de oleorresina do malmequer (30,28 g) com teor de éster de xantofila de 23,10% em peso e percentagem de área de trans-luteína, de cis-luteína e de zeaxantina por HPLC de 67,23, de 22,08 e de 5,18 respectivamente foi transferida para um balão Erlenmeyer (500 mL) seguida pela adição de 125 mL de uma mistura que contém volumes iguais de 2-propanona e de 2-butanona. Isto foi agitado usando um agitador controlado termostaticamente de 15°C até 25°C durante um período de 5-10 horas. Depois de um intervalo de 2 em 2 horas uma amostra foi retirada, filtrada e o material seco precipitado foi analisado para o teor de éster e razão trans-:cis- por HPLC. Finalmente quando o grau desejado da pureza foi alcançado a solução que contém o precipitado foi filtrada através de um funil de Buchner e o precipitado foi seco em secador a vácuo à temperatura ambiente.

O rendimento do concentrado resultante foi 4,34 g (rendimento de 14,35%) e a análise mostrou teor de éster de xantofila de 46,82% em peso, testado por método espectrofotométrico, medição a 474 nm. Este concentrado de ésteres de xantofila continha percentagem de área por HPLC, de trans-luteína 92,68, de cis-luteína 2,81 e de zeaxantina 3,83 respectivamente. Em exame visual, este concentrado mostrou uma cor vermelho laranja melhorada quando comparada com o material de partida que era de cor castanho escuro.

Vantagens da invenção

O concentrado da presente invenção possui 90 até 95% de ésteres de trans-luteína na sua forma natural possuindo estabilidade e biodisponibilidade elevadas. A razão de isómero de trans-Luteína para isómero de cis-Luteína varia desde pelo menos 18:1 até 475:1, ou o produto livre de isómero de cis-Luteína como obtido no concentrado da presente invenção, a partir do processo reivindicado na presente invenção é uma melhoria claramente demonstrável e substancial sobre as invenções apresentadas em técnica anterior ou prevalecente no comércio.

O concentrado da presente invenção é apropriado para consumo humano quer como nutracêutico ou como um aditivo alimentar e também para colorir materiais alimentares e de ração para animais.

O concentrado da invenção pode ser convertido, se desejado, em produtos como microesferas, cápsulas, pílulas, unguentos, cápsulas de gelatina mole, comprimidos, comprimidos mastigáveis, loções/preparações líquidas, etc por métodos convencionais.

Lisboa, 26 de Fevereiro de 2009

REIVINDICAÇÕES

1. Um concentrado de ésteres de xantofila enriquecido com trans-luteína que compreende uma composição que contem ésteres de luteína e de zeaxantina de ácidos gordos,

caracterizado por:

a composição conter em peso 90-95% de ésteres de trans-luteína, 0-5% de ésteres de cis-luteína e 3,5 até 6% de ésteres de zeaxantina.

2. O concentrado de ésteres de xantofila enriquecido com trans-luteína como reivindicado na reivindicação 1, em que a razão de ésteres de trans-luteína:cis-luteína no concentrado varia pelo menos desde 18:1 até 475:1 e o teor de éster de xantofila varia desde 60-80% em peso, preferencialmente 70% em peso.

3. O concentrado de ésteres de xantofila enriquecido com trans-luteína como reivindicado na reivindicação 1 ou 2, em que o concentrado de ésteres de xantofila enriquecido com luteína está na forma de produtos como microesferas, cápsulas, pílulas, unguentos, cápsulas de gelatina mole, comprimidos, comprimidos mastigáveis, loções/preparações líquidas, etc.

4. Um processo para a preparação do concentrado atrás definido de ésteres de xantofila enriquecido com trans-luteína como definido em qualquer das reivindicações 1 até 3 que compreende:

(a) Misturar um extracto ou oleorresina que contem ésteres de xantofila que contêm ésteres de luteína e de zeaxantina de ácidos gordos com um solvente cetónico alifático seleccionado da 2-propanona, 2-butanona e 2-pentanona ou as suas misturas a uma temperatura na gama de 10°C até 30°C sob agitação para selectivamente solubilizar as impurezas do éster de não xantofila e os ésteres de cis-luteína e lípidos presentes aí e simultaneamente enriquecer na mistura resultante o teor dos ésteres de trans-luteína;

(b) Filtrar a mistura resultante para obter o concentrado de ésteres de xantofilas enriquecido com trans-luteína em forma sólida; e

(c) Secar o concentrado sob vácuo à temperatura ambiente; e

(d) Conservar o concentrado a uma temperatura abaixo de 20°C em uma atmosfera inerte e em recipientes opacos hermeticamente fechados para evitar a degradação do concentrado.

5. Um processo como reivindicado na reivindicação 4, em que a referida fonte de éster de xantofila usada é extracto da flor do malmequer.

6. Um processo como reivindicado nas reivindicações 4 ou 5, em que a temperatura empregue para adicionar e misturar o extracto com um solvente cetónico é na gama de 15°C até 30°C, a agitação é efectuada durante um período que varia desde 2 até 15 horas, preferencialmente cerca de 10 horas.

7. Um processo como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 4 até 6, em que a agitação e mistura adicionada no passo 4a) é efectuada durante um período que varia desde 2 até 15 horas, preferencialmente cerca de 10 horas.

8. Um processo como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 4 até 7, em que a temperatura de secagem em vácuo é a uma temperatura na gama de 25°C até 30°C.

9. Um processo como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 4 até 8, em que a razão de peso para volume de oleorresina que contem a fonte de ésteres de xantofila para solvente cetónico (alifático) usou gamas desde 1:3 até 1:15.

10. Um processo como reivindicado em qualquer uma das reivindicações 4 até 9, em que o concentrado resultante de ésteres de xantofila enriquecido com trans-luteína é produzido na forma de produtos como microesferas, cápsulas, pílulas, unguentos, cápsulas de gelatina mole, comprimidos, comprimidos mastigáveis, loções, preparações líquidas, etc por métodos convencionais.

Lisboa, 26 de Fevereiro de 2009

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 3539686 A
- DE 1224597
- US 6313169 B, Bowen and Clark
- US 4648263 A, Phillip
- US 6191293 B, Levy

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- D.E.BREITHAAPT ; A.BAMEDI. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2001, vol. 49, 2064-2070
- F.KHACHIK ; G.R.BEECHER ; W.R. LUSBY. *Journal of Agri. Food Chemistry*, 1988, vol. 36, 938-946
- HERBST et al. *FASEB Journal abstract No. 11*, 1997, 2587
- A.SUBAGIO ; H.WAKAKI ; N.MORITA. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1999, vol. 63 (10), 1784-1786
- W.L.HADDEN ; R.H.WATKINS ; L.W.LEVY ; E.REGALADO ; D.M.RIVADENEIRA ; R.B.VAN BREEMEN ; S.J.SCHWARTZ. *J. Agricultural Food Chemistry*, 1999, vol. 47, 4182-4194
- TYCOZKOWSKI ; HAMILTON. *Poultry Science*, 1991, vol. 70, 651-654
- J A RIDDICK et al. *Organic Solvents Tech Organic Chemistry*. John Wiley and Sons, 1996, vol. II