

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 937**

51 Int. Cl.:

**A23L 33/105** (2006.01)

**A61K 36/28** (2006.01)

**A61P 27/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.09.2010 E 10760417 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2473065**

54 Título: **Una composición de xantofila que contiene pigmentos maculares y un proceso para su preparación**

30 Prioridad:

**30.10.2009 US 256667 P**  
**02.09.2009 IN MU20082009**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**05.05.2016**

73 Titular/es:

**OMNIACTIVE HEALTH TECHNOLOGIES LTD.**  
**(100.0%)**  
**New Technology Centre, Plot A-10, Road No 1,**  
**Wagle Industrial Estate Thane (W)**  
**Maharashtra 400 604, IN**

72 Inventor/es:

**KUMAR T.K., SUNIL y**  
**P. ABDULKADIR, SHERENA**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 568 937 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Una composición de xantofila que contiene pigmentos maculares y un proceso para su preparación

### 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una composición de xantofila que contiene pigmentos maculares y a un proceso para su preparación. La invención se refiere particularmente a una composición de xantofila que contiene pigmentos maculares que consisten en trans-luteína e isómeros de zeaxantina y a un proceso para su preparación. Esta invención se refiere más particularmente a una composición de xantofila que contiene pigmentos maculares que consisten en trans-luteína, isómeros de zeaxantina, en concreto, (R,R)-zeaxantina y (R,S)-zeaxantina derivados del extracto de planta/oleoresina que contiene xantofilas/ésteres de xantofilas que es seguro para el consumo humano y útil para aplicaciones de nutrición y salud. Más particularmente, la presente invención se refiere a una composición de xantofila que contiene al menos 80 % en peso de xantofilas totales, de las cuales el contenido de trans-luteína es de al menos 80 % y siendo el resto isómeros zeaxantina, en concreto, (R,R)-zeaxantina y (R,S)-zeaxantina derivados de los extractos de plantas/oleoresina que contiene xantofilas/ésteres de xantofilas que son seguros para el consumo humano y útiles para aplicaciones de nutrición y salud.

La composición de xantofila de la presente invención es útil como un ingrediente en aplicaciones de nutrición y salud, como un aditivo y/o un colorante para aplicaciones en alimentos y piensos.

### Antecedentes de la invención

La mácula se encuentra en el centro de la retina, directamente detrás del cristalino en el ojo. Es un área pequeña con un color amarillo que consiste en xantofilas como luteína, (R,R)-zeaxantina y (R,S)-zeaxantina y, por tanto, se denominan xantofilas maculares. Estos actúan como antioxidantes que protegen la retina de la degradación oxidativa y ayudan en la visión aguda que se necesita para leer, escribir, conducir y ver objetos claramente. Un daño lento y constante de la mácula durante la vida puede conducir a degeneración macular relacionada con la edad (DME) y a cataratas. Las xantofilas maculares en la dieta o de suplementos pueden ayudar a mantener los ojos sanos. La luteína y la (R,R)-zeaxantina pueden derivar de frutas y verduras, mientras que la (R,S)-zeaxantina procede de alimentos marinos o suplementos dietéticos o de la bioconversión de la luteína en el cuerpo. De las diversas clases de pigmentos, los carotenoides se encuentran entre los más ampliamente distribuidos en la naturaleza, teniendo el rojo, el amarillo y el naranja diversas funciones como captadores de luz y protección contra la fotooxidación destructiva en plantas terrestres.

Aunque se han identificado carotenoides específicos en varias frutas y verduras, plumas de aves, yema de huevo, piel de aves, crustáceos y la región ocular macular, son especialmente abundantes en pétalos de caléndula, maíz y vegetales de hoja. La correlación entre los carotenoides de la dieta y los carotenoides que se encuentran en el suero y el plasma humanos indica que solo los grupos seleccionados de carotenoides hacen su entrada en la corriente sanguínea humana para ejercer su efecto. Cada carotenoide muestra un patrón individual de absorción, transporte en plasma y el metabolismo.

Los carotenoides absorben luz en la región de 400-500 nm del espectro visible. Esta propiedad física confiere el color amarillo/rojo característico de los pigmentos. Los carotenoides contienen una estructura conjugada compuesta por unidades de isopreno, que generalmente están invertidas en el centro de la molécula, de modo que imparten simetría. Los cambios en la configuración geométrica sobre los dobles enlaces dan lugar a la existencia de muchos isómeros cis- y trans. Las especies de mamíferos no sintetizan carotenoides y, por tanto, estos tienen que obtenerse de fuentes dietéticas, tales como frutas, verduras y yemas de huevo. En los últimos años, se ha informado de que los carotenoides tienen varios beneficios para la salud, que incluyen la prevención y la protección contra trastornos graves de salud.

Los carotenoides son compuestos no polares clasificados en dos subclases, en concreto, compuestos polares llamados xantofilas u oxicarotenoides y carotenos de hidrocarburos no polares como el beta-caroteno, licopeno, etc. Ambas subclases tienen al menos nueve dobles enlaces conjugados responsables de los colores característicos de los carotenoides. Las xantofilas tienen estructuras anulares en el extremo de la cadena de doble enlace conjugado con funciones polares como un grupo hidroxilo o ceto. Los ejemplos de xantofilas incluyen luteína, zeaxantina, capsantina, cantaxantina, beta-criptoxantina, astaxantina, etc. Como colorantes naturales y también por su papel en la salud humana, las xantofilas como la luteína, la (R,R)-zeaxantina y la (R,S)-zeaxantina han atraído la atención renovada de los científicos e investigadores en el campo biomédico, químico y nutricional en los últimos años.

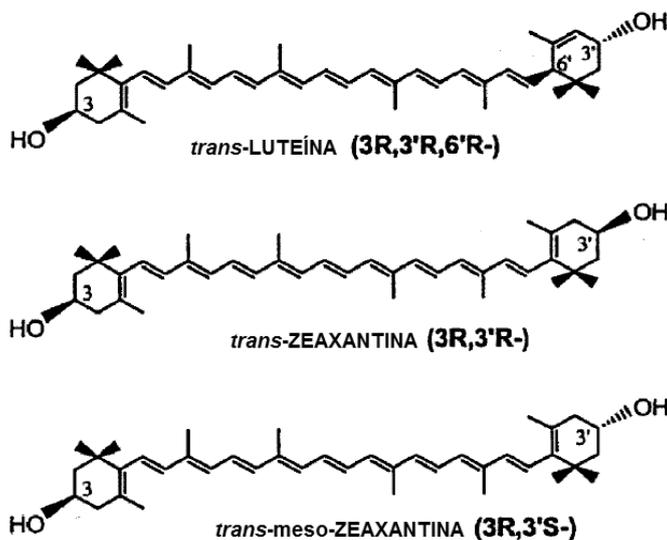
La luteína y la zeaxantina contribuyen a los colores amarillo y naranja-amarillo, respectivamente. La luteína y la zeaxantina pueden estar presentes en material vegetal en forma libre y también en forma de éster. La luteína está presente en los vegetales de hojas verdes como la espinaca, la col rizada y el brócoli en forma libre; las frutas como el mango, la naranja y la papaya; el pimentón rojo, las algas, el maíz amarillo, contienen luteína en la forma de sus ésteres. También está presente en la circulación sanguínea y en diversos tejidos en el cuerpo humano y, en particular, en la mácula, el cristalino y la retina del ojo.

La luteína se denomina químicamente beta -ε- caroteno 3,3'-diol. La zeaxantina se forma mediante la adición de dos grupos hidroxilo al beta-caroteno. Dado que las posiciones están en hidroxilo 3 y 3', el nombre químico de la zeaxantina es beta, beta-caroteno-3,3'-diol. El nombre común de la zeaxantina procede de *zea mays* porque este carotenoide se identificó por primera vez en el maíz (*Zea mays*).

Más adelante se puede ver que la luteína no es simétrica, ya que la posición del doble enlace en el anillo de la izquierda no es idéntica a la posición del doble enlace en el anillo de la derecha. La zeaxantina es completamente simétrica con respecto a los anillos de la izquierda y de la derecha debido a un doble enlace conjugado adicional en comparación con la luteína.

Las xantofilas pueden mostrar tanto isómeros ópticos (R y S-estereoisómeros) como geométricas (trans, E- y cis, Z-). La conformación de estereoisómeros R y S se basa en estudios de HPLC en columna quirales y de espectros CD, mientras que la conformación de los isómeros cis y trans se basa en estudios de espectroscopia online electrónicos, de infrarrojos, de RMN, de HPLC-EM y HPLC-RMN. Se sabe que cuando una molécula orgánica tiene un átomo de carbono con cuatro tipos diferentes de átomos o grupos unidos a la misma, ese átomo de carbono de denomina átomo de carbono quiral. El átomo de carbono quiral es responsable de dos disposiciones espaciales diferentes que conducen a la formación de isómeros ópticos, mientras que el número de dobles enlaces de la cadena de polieno y la presencia de un grupo metilo y la ausencia de impedimento estérico deciden el número de isómeros trans- y cis-. En el caso de la trans-zeaxantina, los átomos de carbono en las posiciones 3 y 3' n los dos anillos de los extremos son ambos átomos quirales.

Por lo tanto, la trans-zeaxantina tiene dos centros quirales en los átomos de carbono C3 y C3', basados en las posiciones de los grupos hidroxilo secundarios unidos a ellos. Por lo tanto, hay cuatro posibles estereoisómeros de la trans-zeaxantina, en concreto, el isómero (3R,3'R), el isómero (3S, 3'S) y el isómero (3R-3'S)- o (3S-3'R). En estos isómeros (3R-3'S)- y (3S-3'R)- son idénticos. Por lo tanto, hay tres isómeros quirales de la trans-zeaxantina. El isómero que provoca rotación de la luz polarizada a la derecha se llama estereoisómero R, el isómero que provoca rotación hacia la izquierda estereoisómero S y el tercer isómero que posee efectos dobles opuestos (R, S; ópticamente inactivo) que se llama mesoforma de la zeaxantina. Las fórmulas estructurales de la luteína, (R,R)-zeaxantina y (R,S)-mesozeaxantina se dan a continuación.



Estructuras químicas de las xantofilas maculares.

Los dobles enlaces conjugados de la luteína y la zeaxantina contribuyen a los colores característicos de cada pigmento y también influyen sobre la capacidad de estos para inactivar el oxígeno singlete. Debido al doble enlace conjugado adicional, se cree que la zeaxantina es un antioxidante fuerte en comparación con la luteína.

El pigmento macular del ojo está compuesto principalmente por tres pigmentos de xantofila (o xantofilas maculares), en concreto (3R,3'R,6'R)-luteína, (3R,3'R)-zeaxantina y (3R,3'S)-zeaxantina en el orden de 36, 18 y 18 % del contenido total de carotenoide de la retina junto con el 20 % restante que consiste en carotenoides minoritarios como oxo-luteína, epi-luteína y ε-,ε-caroteno 3,3'-diona (J. T. Landrum y R. A. Bone, Lutein, Zeaxanthin a the Macular Pigment, Arch. Biochem. Biophys., 385, 28-40, 2001).

Aunque estos pigmentos de xantofila se encuentran en todos los tejidos del ojo, la concentración más alta se observa en la mácula lútea de la retina, incluyendo una depresión central en la retina llamada fovea. La concentración de los pigmentos de xantofila aumenta progresivamente hacia el centro de la mácula y en la fovea, la concentración de estos pigmentos de xantofila es aproximadamente mil veces mayor que en otros tejidos humanos. (Landrum et al., Analysis of Zeaxanthin Distribution within Individual Human Retinas, *Methods in Enzymology*, L. Packer (editor) 213A, 457-467, Academic Press 1992). La fovea es un área relativamente pequeña dentro de la mácula, donde los fotorreceptores de los conos alcanzan su concentración máxima. Aproximadamente el 50 % de las cantidades totales de las xantofilas se concentran en la mácula, donde la zeaxantina domina sobre la luteína en una relación 2:1 (Handelman et al., Measurements of Carotenoids in Human a 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 a Photobiology*, 78, 138-145, 2003). En el centro de la fovea de la retina, la zeaxantina es una mezcla 50:50 de (trans-3R,3'R)-zeaxantina y (trans-3R,3'S)-zeaxantina junto con una pequeña cantidad de (3S,3'S)-zeaxantina (J. T. Landrum a R. A. Bone, Lutein, Zeaxanthin a The Macular Pigment, *Arch. Biochem. Biophys.*, 385, 28-40, 2001).

La fovea es particularmente importante para la función visual adecuada (por ejemplo, la agudeza), se sabe que las enfermedades y los daños en esta zona producen lugar ceguera legal. Por ejemplo, la degeneración macular relacionada con la edad (DME) se caracteriza por cambios patológicos en la retina, el epitelio pigmentario retiniano (EPR) y/o la coroides, y afecta preferentemente a la región macular de la retina. Esta es la principal causa de pérdida de visión irreversible en Estados Unidos, entre las personas de más de 65 años de edad y no existe un tratamiento establecido para la mayoría de los pacientes. La pérdida de la visión central da lugar a la posible incapacidad para reconocer caras, leer o escribir o conducir un coche y, por lo tanto, tiene un efecto importante sobre la capacidad de un individuo para vivir de forma independiente. Existe una amplia evidencia epidemiológica que apoya un papel para la ingesta dietética de luteína y zeaxantina en diferentes formas isoméricas en la protección contra las cataratas relacionadas con la edad y la degeneración macular. La detección de productos de oxidación de la luteína y la zeaxantina en la retina humana apoya la hipótesis de que la luteína y la zeaxantina dietéticas pueden actuar como antioxidantes en la región macular. (Khachik et al., Identification of Lutein a Zeaxanthin Oxidation Products in Human a Monkey Retinas, *Invest. Ophthalmol. and Vis. Sci.*, 38, 1802-1811, 1997).

De los 40 a 50 carotenoides que normalmente se consumen en la dieta humana, la luteína y la zeaxantina, se depositan en un contenido hasta 5 veces mayor en la región macular de la retina en comparación con la retina periférica. La zeaxantina se acumula preferentemente en la región foveal, mientras que la luteína es abundante en la región perifoveal.

En cuanto a la ubicación de las xantofilas a nivel celular, se ha notificado que están unidas a proteínas específicas conocidas como proteínas de unión a xantofilas (XBP). Se ha sugerido que la XBP está implicada en la captación de luteína y zeaxantina desde la corriente sanguínea y la estabilización de la misma en la retina. El estudio de las xantofilas y la XBP mediante espectroscopia de absorción transitoria femtosegundo mostró mejor estabilidad para la XBP enriquecida en (3R,3'S)-zeaxantina en comparación con (3R, 3'R)-zeaxantina mientras que las propiedades fotofísicas de las xantofilas. En general, la (3R,3'R)-zeaxantina y la (3R, 3'S, meso)-zeaxantina son idénticas. Es probable que la mesozeaxantina esté mejor acomodada con la XBP donde la proteína protege las xantofilas de la degradación por los radicales libres. Por lo tanto, el complejo puede ser una mejor antioxidante que las xantofilas libres, de modo que se facilita la mejora de la protección del tejido ocular frente a los daños oxidativos. (Billsten et al., Photophysical Properties of Xanthophylls in Caroteno proteins from Human Retina, *Photochemistry a Photobiology*, 78, 138-145, 2003)

Se han atribuido diversas funciones a los pigmentos maculares, incluyendo la reducción de los efectos dañinos de la fotooxidación de la luz azul absorbida por el ojo, la reducción de los efectos de la dispersión de la luz y la aberración cromática en el rendimiento visual, y la protección contra los efectos adversos de las reacciones fotoquímicas debido a las propiedades antioxidantes de los carotenoides.

Se ha demostrado la capacidad de aumentar la cantidad de pigmento macular mediante suplementación de la dieta con luteína (Landrum et al., Dietary Lutein Supplementation Increases Macular Pigment, *FASEB. J.*, 10, A242, 1996). La función de visión reducida debido a cataratas y a la ceguera del adulto por DME puede controlarse sustancialmente consumiendo frutas y vegetales y suplementos dietéticos que contengan luteína y (R,R)-zeaxantina y (R,S)-zeaxantina disponibles en alimentos marinos que rechazan la población vegetariana. Aunque la (R,S)-zeaxantina presente en el ojo se considera un producto metabólico procedente de la luteína, ahora se reconoce que la necesidad de que la suplementación dietética de (R,S)-zeaxantina mejora la densidad del pigmento macular. (Landrum y Bone, *Functional Foods a Nutraceuticals*, 1 Sep. 2001). Del mismo modo, el estudio ha demostrado que la (R,R)-zeaxantina entra en la sangre y, finalmente, en la 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). En ensayos clínicos se ha demostrado que los suplementos dietéticos con luteína y zeaxantina aumentan la densidad del pigmento macular y las concentraciones en suero de estos carotenoides (Bone \*et. al., Lutein a Zeaxanthin Dietary Supplements Raise Macular Pigment Density a Serum Concentrations of These Carotenoids in Humans. *J. Nutr.*, 133, 992-998, 2003).

#### • Fuentes dietéticas de luteína y zeaxantina

La luteína es un carotenoide que se encuentra habitualmente en la mayoría de las frutas y los vegetales, mientras que la zeaxantina en la forma de isómero (R,R) está presente solo en cantidades minoritarias en la mayoría de las frutas y los vegetales. Las fuentes dietéticas de zeaxantina están limitadas a alimentos verdes, determinadas frutas amarillas/naranjas y vegetales tales como maíz, nectarinas, naranjas, papayas, caquis y calabaza. *Capsicum annuum* es otra especie más común ampliamente utilizada que es una buena fuente de zeaxantina. La planta de Goji (*Lycium barbarum*), fructus lycii o Gou Qi Zi tiene pequeñas bayas rojas que se usan de forma habitual en la cocina casera china y se ha demostrado que tiene un contenido elevado de zeaxantina (principalmente como dipalmitato de zeaxantina) pero cantidades insignificantes de luteína. El fruto seco de goji lo prescriben los herboristas chinos como agente terapéutico para una serie de enfermedades de los ojos. En Francia, se ha indicado que el dipalmitato de luteína (Helenien) aislado de hojas de flor de *Helenium autumnale* se usa para el tratamiento de trastornos oculares. (Wolfgang Gau, Hans-Jurgen Ploschke y Christian Wunsche, Mass Spectrometric Identification of Xanthophylls Fatty Acid Esters From Marigold Flowers (*Tagetes erecta*) Obtained by HPLC a Craig Counter Current Distribution. J. Chrom. 262,277-284,1983)

Como ya se ha mencionado anteriormente, la fuente dietética de la mesozeaxantina es principalmente mariscos como gambas, pescados, tortugas, etc, de modo que la población vegetariana está privada de mesozeaxantina. Sin embargo, existe una patente disponible para la composición farmacéutica que contiene mesozeaxantina para el tratamiento de trastornos de la retina, como el aumento de la deposición de pigmentos maculares en el ojo humano, y el tratamiento terapéutico o la profilaxis de la DME (Howard et al., Meso-zeaxanthin Formulations for Treatment of Retinal Disorders, patente de Estados Unidos n.º 6, 329, 432, 2001).

La luteína y la zeaxantina se encuentran de manera natural en su forma transisomérica en frutas, verduras y flores (caléndula). Debido a las condiciones de procesamiento debidas al calor y a la luz, un pequeño porcentaje de la forma isomérica trans se convierte en la forma cis. Por lo tanto, la forma biodisponible preferida es trans-isomérica, como se pone de manifiesto a partir de los datos del análisis de la composición de los isómeros geométricos de del 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). En vista de esto, es deseable usar la forma trans-isomérica de la luteína y la zeaxantina como (R,R)-, (R,S)- en los suplementos dietéticos.

Hasta la fecha se sabe poco sobre el mecanismo de formación, la captación y la deposición de mesozeaxantina en la retina del ojo. Khachik et al. han notificado la presencia de 2-3 % de (3R,3'S, meso)-zeaxantina en veinte muestras de plasma humano normal y han propuesto las vías metabólicas de su formación a partir de luteína y zeaxantina dietéticas. No está claro si la deposición de mesozeaxantina en la retina se dirige a través del suero o se produce a partir de luteína/zeaxantina dentro de la retina. (Khachik et al., en un capítulo sobre carotenoides de la dieta y sus metabolitos como agentes quimioprotectores potencialmente útiles contra el cáncer, en "Antioxidant food supplement in human health, Eds. Packer et al., Academic Press London, páginas 203-29, 1999). No obstante, Breithaupt et al. no hallaron la presencia de mesozeaxantina en plasma humano obtenido 24 horas después de la ingestión de (3R,3'R)-zeaxantina (en forma de éster o libre) en un estudio de ciego único con grupos cruzados usando dos grupos cada uno de ellos compuesto por seis voluntarios. Se usó CL-Appl-EM quiral para la detección en la muestra de plasma acumulado. (Breithaupt et al., Comparison of Plasma Responses in Human subjects after the Ingestion of (3R,3'R)-zeaxanthin Dipalmitate from Wolfberry (*Lycium barbarum*) a Non-esterified (3R,3'R)-zeaxanthin using Chiral HPLC, Brit. J. Nutr. 91, 707-713,2004, 2004).

Existen pruebas y motivos que avalan la hipótesis de que los carotenoides luteína, zeaxantina y mesozeaxantina están biodisponibles fácilmente y, en consecuencia, aumentan los niveles de pigmentos maculares (Landrum a Bone, Meso-zeaxanthin-A Cutting Edge Carotenoid, Functional Foods a Nutraceuticals, 10 Sep. 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 a Meso-zeaxanthin. Proc. Nutr. Soc., 105A, (2006); Thurnham et al., Macular Zeaxanthin a Lutein -a Review of Dietary Sources a Bio-availability a Some Relationship with Macular Pigment Optical Density a 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 a (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).

En nuestros días, existe una gran demanda de cristales de xantofila que contienen altas cantidades de trans-luteína y/o zeaxantina para su uso como antioxidantes, prevención de cataratas y degeneración macular, como agente preventivo del cáncer de pulmón, como agentes para la absorción de la a luz ultravioleta dañina de los rayos solares e inactivadores de especies de oxígeno reactivo y radicales libres fotoinducidos, etc. Ahora hay disponible una serie de productos comerciales de fuentes naturales para facilitar la formulación de productos industriales y comerciales con luteína o (R,R)-zeaxantina. Sin embargo, según el conocimiento de los inventores, no se dispone de composición de xantofila que contenga todas las xantofilas maculares esenciales y altas concentraciones de, particularmente, trans-luteína al menos 85 % y el resto comprende (R,R)-zeaxantina y (R,S)-zeaxantina en proporciones iguales o superiores derivadas de la misma fuente natural (pétalos de flores de caléndula) como la

luteína zeaxantina comercia. Se han encontrado pruebas del papel protector de la trans-luteína, la (R,R)-zeaxantina y la (R,S)-zeaxantina en el mantenimiento de la salud ocular según la correlación entre los suplementos dietéticos frente a los niveles en suero y la densidad del pigmento macular (Bone et al, Macular Pigment Response to a Supplement Containing Meso-zeaxanthin, Lutein a Zeaxanthin, Nutr. Metabol.11.1-8(2007); Bone et al., Macular Pigment Response to a Xanthophyll Supplement of Lutein, Zeaxanthin a 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 a (3R,3'R,6'R)lutein, Brit. J. Nutr. 99,1-8(2008).

#### Técnica anterior

El pigmento macular del ojo está compuesto principalmente por luteína, R,R)-zeaxantina y (R,S)-zeaxantina en una relación aproximada de 2: 1:1 en la retina. Estos pigmentos representan el 72 % de los carotenoides totales en el ojo y siendo el resto otros carotenoides (Landrum y Bone, Lutein Zeaxanthin a the Macular Pigments, Arch. Biochem. Biophys. 385,28-40,2001). El pigmento de las xantofilas predominante en la dieta es la luteína y procede de frutas y vegetales. La ingesta media de luteína en EE. UU. es de entre 1 y 3 mg al día, que incluye aproximadamente 10 - 20 % de (R,R)-zeaxantina (E. Y. Chew y San Gio Vanni, "Lutein" in Encyclopedia of Dietary Supplements, página 409-420,2005 publicado por Marcel Dekker). La (R,S)-zeaxantina no se encuentra en la dieta normal, pero está presente en ciertos alimentos del mar como gambas, peces y tortugas. (Maoka et. al., The First Isolation of Enantiomeric a Meso-zeaxanthin in Nature. Comp. Biochem. Physiol., 83B, 121-124, 1986). En los últimos años se ha notificado que hay importantes cantidades de zeaxantina, es decir, (R,R)-zeaxantina, presentes en las yemas de huevo de pollo en México procedente de piensos para pollo que contienen (R,R)- y (R,S)-zeaxantina. (Thurnham et. al, A Supplementation Study in Human Subjects with a Combination of Meso-zeaxanthin, (3R,3'R)-zeaxanthin a (3R,3'R,6'R)-lutein, Brit. J. Nutr. 99,1-8 (2008)). Durante los últimos 5 años se dispone de suplementos dietéticos que contienen (R,S)-zeaxantina en los mercados de Estados Unidos comercializados con las marcas "Lutein Plus" y "LMZ3" y en Europa como "Lutein Plus" y "Macushield".

Además, existen formulaciones farmacéuticas que contienen (R,S)-zeaxantina para aumentar la densidad del pigmento macular en el ojo humano y para el tratamiento terapéutico o la profilaxis de enfermedades y trastornos de la mácula. (Howard et. al., Meso-zeaxanthin Formulations for Treatment of Retinal Disorders, patente de Estados Unidos n.º 6.379.432, 2001). Los suplementos dietéticos de luteína contienen principalmente 80-90 % de luteína y cantidades bajas de zeaxantina y ausencia total de (R,S)-zeaxantina. La composición de xantofila de las muestras mezcladas: es decir Lutein Plus; 50 % de luteína, 13 % de (R,R)-zeaxantina y 37 % de (R,S)-zeaxantina; 54 % de luteína, 6 % de (R,R)-zeaxantina y 40 % de (R,S)-zeaxantina (Thurnham et al, A Supplementation Study in Human Subjects with a Combination of Meso-Zeaxanthin,(R,R)-zeaxanthin a Lutein, Brit. J. Nutr. 99,1-8(2008); Quantum Nutritionals, MI 48390, EE.UU.; 25 % de luteína, 6 % de (R,R)-zeaxantina y 68 % de (R,S)-zeaxantina.; Bone et al., Macular Pigment Response to a Supplement Containing Meso-zeaxanthin, Lutein a Zeaxanthin, Nutri. Metabol 4,12,2007); concentrado de mesozeaxantina, 5 % de luteína, 5 % de (R,R)-zeaxantina y 85 % de (R,S)-zeaxantina; liofilizado de yema de huevos de gallina 34 % de luteína, 12,80 % de (R,R)-zeaxantina y 7,20 % de (R,S)-zeaxantina y otros carotenoides (Thurnham, Macular Zeaxanthin a Lutein-A Review of Dietary Sources a Bio-availability a Some Relations with MPOD a ARMD, Nutri. Res. Reviews 20,163-179,2007). (R,S)-zeaxantina pura de más de 99 % de pureza (Schlatteer 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 de Estados Unidos n.º 6.743.954, 2004); composición de xantofila 3,53 % de luteína, 5,77 % de (R,R)-zeaxantina y 90,57 % de (R,S)-zeaxantina (Kumar et al., publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2007/0265351). Recientemente se ha notificado que una combinación de suplementos dietéticos de formulación cobeadlet que consiste en 2 mg de luteína, 0,5 mg de zeaxantina y 0,5 mg de (R,S)-zeaxantina inhibe el proceso de degeneración macular y estimula la visión sana (Lang, Composition a methods for inhibiting the progression of macular degeneration a promoting healthy vision, patente de Estados Unidos n.º 7.267.830, 2007). En el documento US 6 743 953 se divulga un proceso para la preparación de cristales de xantofila que comprenden al menos 85 % de xantofilas de la cuales el contenido de trans-luteína es al menos un 90 %, siendo el resto zeaxantina, cantidades restos de cis-luteína y otros carotenoides.

Ya en 1946, Karrer y Jucker notificaron la reacción de isomerización catalizada por etóxido sódico de la luteína en zeaxantina (P. Karrer a E. Jucker, Helv. Chim. Acta, 30, 266, 1947). Después, en 1971-72 Buchecker et al. asignaron quiralidad R a la luteína según en análisis PMR y los intentos para isomerizar la luteína en R,R-zeaxantina han fallado (Chimia, 25, 192,1971; ibid, 26, 134, 1972). Andrewes et al. notificaron los aspectos estereoquímicos de la reacción de isomerización de (3R,3'R, 6R)-luteína (ópticamente activa), que dieron lugar a (3R,3'S)-zeaxantina que era transisomérica y ópticamente inactiva según los estudios de espectros CD (Isomerization of Epsilon-carotene to Beta-carotene a Lutein to Zeaxanthin, Acta Chem. Scand., B28, 139,1974). El proceso anterior da lugar a un rendimiento bajo de 10 a 15 % de (3R,3'S, meso)-zeaxantina ópticamente inactiva y usa benceno y DMSO, cuyo uso en alimentos y suplementos de salud es cuestionable.

Rodriguez ha descrito un método de isomerización de la luteína para producir una mezcla de epímeros de zeaxantina mediante el empleo de medios no acuosos y calentamiento una mezcla de álcali y propilenglicol. Aunque el espectro de dicroísmo circular indicó la formación del mesoisómero de zeaxantina, no se hicieron intentos para cuantificar el contenido de mesozeaxantina y también proporcionar la composición de los productos isomerizados.

(Patente de Estados Unidos n.º 5.973.211, 1999). De acuerdo con los conocimientos de los inventores, en el presente documento no se ha notificado una composición de xantofila de calidad alimentaria que contenga al menos 80 % en peso de xantofilas totales, niveles más altos de contenido de trans-luteína (70 a 80 %) y siendo el resto (R,R)-zeaxantina y (R,S)-zeaxantina no se informó hasta el momento. Dicha composición se formará un ideal y suplementos dietéticos esenciales que ayudan en el mantenimiento de una visión saludable. Adicionalmente, puede considerarse que la composición es segura según los factores que avalan los reactivos empleados en el proceso y los datos de la literatura disponibles en relación con la seguridad toxicológica de las xantofilas individuales similares. (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 n.º 156704370(2006).

Los seres humanos consumen de 1 a 3 mg de luteína al día y la relación luteína: Zeaxantina en la dieta es de aproximadamente 5:1, (Petra A Thürmann, Wolfgang Schalch, Jean-Claude Aebischer, Ute Tenter y William Cohn, Plasma kinetics of lutein, zeaxanthin, a 3-dehydro-lutein after multiple oral doses of a lutein supplement, American Journal of Clinical Nutrition, Vol. 82, n.º 1, 88-97, July 2005; Nebeling LC, Forman MR, Graubard BI, Snyder RA. Changes in carotenoid intake in the United States: the 1987 a 1992 National Health Interview Surveys. J Am Diet Assoc, 99:1-6, 1997; Le Marchand L, Hankin JH, Bach F, et al. An ecological study of diet a 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 a total carotenoids among Americans age 50 and above. FASEB J, 13:A554 (abstr)., 1999)

La relación de luteína:zeaxantina en plasma es de 4 o 5:1 (Emily Chew y John Paul SanGiovanni, en Encyclopedia of Dietary Supplements, Ed. Paul Coates, Marcel Dekker, páginas 409-421, 2005)

En las circunstancias explicadas anteriormente, es deseable y útil que la industria y los formuladores de productos nutricionales dispongan de un concentrado de xantofila que consista en todas las xantofilas maculares obtenidas de un proceso comercialmente escalable y hechas del mismo material de fuente natural mismo que es el que ya está aceptado por la mercado para luteína, (R,R)-zeaxantina y (R,S)-zeaxantina. El producto preparado debería tener una relación de luteína:zeaxantina de 5:1, como se encuentra en la dieta regular y en el plasma. El producto preparado de ese modo también debe hacerse a partir de disolventes seguros (GRAS) para la producción de suplementos dietéticos adecuados para consumo humano, con residuos de disolventes y especificaciones de la luteína e isómeros de zeaxantina teniendo en cuenta la función visual y las exigencias del mercado.

### Objetivos de la presente invención

Por tanto, el objetivo principal de la presente invención es proporcionar una composición de xantofilas que contiene pigmentos maculares que consisten en trans-luteína e isómeros de zeaxantina es decir (R,R)-zeaxantina y (R,S)-zeaxantina derivadas del extracto de planta/oleoresina que contiene xantofilas/ésteres de xantofila que es segura para consumo humano y útil para nutrición y atención sanitaria, que comprende al menos un 80 % en peso de xantofilas totales, de las cuales la relación de trans-luteína e isómeros de zeaxantina está en el intervalo de 4:1 a 6:1 y la relación de los isómeros de zeaxantina está en el intervalo de 80 a 20:20 a 80.

Otro objetivo más de la presente invención es proporcionar una composición de xantofila como se ha definido anteriormente, que contiene al menos 85% en peso de xantofilas totales, de las cuales el contenido de trans-luteína es de al menos 85% en peso y siendo el 15 % restante isómeros zeaxantina, en concreto, (R,R)-zeaxantina y (R,S)-zeaxantina derivados de los extracto de plantas/oleoresina que contiene xantofilas/ésteres de xantofilas que son seguros para el consumo humano y útiles para nutrición y atención sanitaria.

Otro objetivo más de la presente invención es proporcionar una composición de xantofila como se ha definido anteriormente, donde la composición contenga al menos un 85 % en peso de xantofilas totales, siendo al menos el 80 % en peso de las cuales trans-luteína, siendo el 15 % restante en peso isómeros de zeaxantina, es decir (R,R)-zeaxantina a (R,S)-zeaxantina derivados del extracto de plantas/oleoresina que contiene xantofilas/ésteres de xantofilas seguras para consumo humano y útiles para nutrición y atención sanitaria.

Aún otro objetivo de la presente invención es proporcionar un proceso definido por las reivindicaciones para la preparación de la composición de xantofila que contiene pigmentos maculares que consisten en trans-luteína, isómeros de zeaxantina, en concreto, (R,R)-zeaxantina y (R,S)-zeaxantina derivados del extracto de planta/oleoresina que contiene xantofilas/ésteres de xantofilas que es seguro para el consumo humano y útil para aplicaciones de nutrición y atención sanitaria.

Los objetivos mencionados anteriormente se han logrado con la presente invención según los siguientes hallazgos de los inventores que:

- a) la etapa de saponificación para convertir los ésteres de xantofila presentes en el extracto de planta/oleoresina en la forma desesterificada se puede combinar con isomerización limitada de la luteína para producir la composición de xantofila que contiene una cantidad mayor de trans-luteína, siendo el resto isómeros de zeaxantina, es decir (R,R)-zeaxantina y (R,S)-zeaxantina, y restos de otros carotenoides derivados del extracto de planta/oleoresina que contiene xantofila/ésteres de xantofilas, segura para consumo humano y útiles para

nutrición y atención sanitaria,

b) en la etapa de saponificación, el hidróxido potásico o el hidróxido sódico se pueden disolver en 1-propanol sin la adición de agua,

5 c) la temperatura de la saponificación/isomerización puede estar entre 70 y 100 °C, preferentemente a aproximadamente 95 grados, y el periodo de saponificación puede ser de 1-2 horas, y

d) el acetato de etilo usado en el proceso se puede recuperar y usar en caso necesario, de modo que se abarata el proceso.

### Sumario de la invención

10 De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona una composición de xantofilas que contiene pigmentos maculares que consisten en trans-luteína, isómeros de zeaxantina es decir (R,R)-zeaxantina y (R,S)-zeaxantina, derivados del extracto de planta/oleoresina que contiene xantofilas/ésteres de xantofilas que es segura para consumo humano y útil para nutrición y atención sanitaria, que comprende al menos un 80 % en peso de xantofilas  
15 totales, la relación de las cuales de trans-luteína e isómeros de zeaxantina está en el intervalo de 4:1 a 6:1 y estando la relación de los isómeros de zeaxantina en el intervalo de 80 a 20: 20 a 80. En algunas realizaciones, la relación entre la transluteína y los isómeros de zeaxantina está en una proporción de aproximadamente 5:1.

20 De acuerdo con otra realización de la presente invención se proporciona una composición de xantofilas donde la composición contiene al menos un 85 % en peso de xantofilas totales, cuyo contenido de trans-luteína es de al menos 85 % y estando la relación de trans-luteína y los isómeros de zeaxantina en el intervalo de 4:1 a 6:1 y estando la relación de los isómeros de zeaxantina en el intervalo de 80 a 20: 2 a 80.

25 De acuerdo con todavía otra realización de la presente invención se proporciona una composición de xantofilas como se ha definido anteriormente, donde la composición contiene al menos un 85 % en peso de xantofilas totales, siendo al menos el 80 % en peso de las cuales trans-luteína, siendo el 15 % restante isómeros de zeaxantina, es decir, (R,R)-zeaxantina y (R,S)-zeaxantina.

30 De acuerdo con una realización adicional de la presente invención se proporciona un proceso para la preparación de una composición de xantofila que contiene pigmentos maculares que consisten en trans-luteína, isómeros de zeaxantina, en concreto, (R,R)-zeaxantina y (R,S)-zeaxantina derivados del extracto de planta/oleoresina que contiene xantofilas/ésteres de xantofilas que es seguro para el consumo humano y útil para aplicaciones de nutrición y atención sanitaria, que comprende:

35 (a) saponificar e isomerizar parcialmente de forma simultánea los ésteres de xantofila presentes en el extracto de planta/oleoresina que contiene ésteres de xantofilas mediante mezcla del extracto/oleoresina con solución alcalina de 1-propanol, estando la proporción de álcali y 1-propanol en el intervalo de 1:0,5 a 1:1 en peso/volumen, calentando la masa resultante a una temperatura en el intervalo de 70-100 °C, preferentemente a  
40 95 °C durante un periodo en el intervalo de 1 a 5 horas para obtener un concentrado bruto saponificado/isomerizado.

45 (b) mezclar el concentrado bruto saponificado/isomerizado resultante obtenido en la etapa (a) con agua, estando la relación del concentrado y el agua usados en el intervalo de 1: 2 a 1:3 volumen/volumen, para formar una mezcla oleosa diluida

(c) extraer la mezcla oleosa diluida obtenida en la etapa (b) con acetato de etilo, estando la proporción de la mezcla oleosa y el acetato de etilo en el intervalo de 1:1,5 a 1:2 en volumen/volumen para conseguir un extracto que contenga la composición de xantofilas

50 (d) evaporar la composición obtenida en la etapa (c) para eliminar el acetato de etilo

(e) purificar la composición resultante de la etapa (d) lavando primero con disolventes no polares y después polares, y filtrar

55 (f) secar la composición resultante al vacío a una temperatura en el intervalo de 40 a 45 °C durante un periodo que varía de 48 a 72 horas.

60 (g) si se desea, recuperar el acetato de etilo usado en la etapa (c) mediante métodos convencionales y, si se requiere, reutilizar, y

(h) almacenar la composición resultante en una atmósfera inerte a -20 °C.

65 Ajustando la temperatura, el periodo y la cantidad de álcali en la etapa (a) (a) las relaciones en las etapas (b) y (c) se puede obtener la composición deseada en la presente invención.

Cabe destacar que la invención prevé el uso de vegetales de hoja y verdes, maíz, frutas y caléndula como la fuente de la oleoresina de xantofilas. Considerando que la luteína está presente con zeaxantina en forma libre asociada on cantidades grandes de clorofila y otros carotenoides indeseables en la mayoría de las frutas, aunque de acuerdo con la presente invención es posible el uso de vegetales de hoja y verdes, maíz frutas y considerando la concentración baja de luteína y zeaxantina en los materiales anteriores y además no siendo las etapas elaboradas de la purificación necesaria baratas, la caléndula es la elección preferida como material de partida para la preparación de la composición de la presente invención.

Específicamente, la oleoresina de caléndula de calidad alimentaria disponible comercialmente producida mediante extracción en hexano se puede usar como material de partida (Kumar et. al Process for the Preparation of Xanthophylls Crystals, patente de Estados Unidos n.º 6.743.953, 2004; Kumar patente de Estados Unidos n.º 6.737.535, 2004) para la preparación de la composición de xantofilas que comprende trans-luteína e isómeros de zeaxantina.

La flor de caléndula (*Tagetes erecta*) se considera la mejor fuente comercial posible de trans-luteína, ya que contiene mono- y diésteres de luteína como principales constituyentes carotenoides. El extracto/oleoresina de caléndula obtenido de la harina de la flor seca contiene aproximadamente un 20-40 % de ésteres de luteína, según la variedad de cultivo y el proceso de extracción. Además de luteína, la caléndula también contiene 5 % de (R,R)-zeaxantina y restos de alfa- y beta-criptoxantina y beta-caroteno. (Khachik patente de Estados Unidos 5.382.714,1995)-

El álcali usado en la etapa (a) se puede seleccionar de hidróxido sódico o hidróxido potásico.

El disolvente no polar usado en la etapa (d) puede ser un disolvente de hidrocarburo que se puede seleccionar a partir de pentano, hexano y heptano, preferentemente hexano. El disolvente polar usado en la etapa (e) puede seleccionarse de un alcohol alifático inferior.

La atmósfera inerte usada para el almacenamiento de la composición resultante se puede mantener en un gas inerte como el nitrógeno.

### Descripción detallada del proceso

En la presente invención, el extracto que contiene éster de xantofila se mezcla con 1-propanol, donde el álcali ya está disuelto. La proporción de álcali y 1-propanol y el extracto de planta es de 0,5 - 1: 0,5 - 1,0 y 1,0 respectivamente. La mezcla se calienta hasta una temperatura de 90 °C y se mantiene durante 1-5 horas, con agitación. Las xantofilas totales en la mezcla de reacción se determina mediante análisis espectrofotométrico (AOAC-16ª Edición Method 970.64), mientras que el análisis HPLC de la misma proporciona el porcentaje de trans-luteína y zeaxantina. (Hadden et al., J. Agric. Food. Chem, 47,4189-494,1999).

La saponificación del extracto/oleoresina da como resultado la liberación de xantofilas en forma libre junto con sales alcalinas de ácidos grasos. La reacción de isomerización convierte parte de la luteína de la caléndula en (R,S)-zeaxantina. La isomerización de la luteína en isómeros de zeaxantina se puede variar cambiando los parámetros del proceso tales como la relación álcali:disolvente, la temperatura y la duración. La composición de las xantofilas en la mezcla de reacción se analiza mediante la extracción en hexano:acetona:etanol:tolueno (10: 7: 6: 7 v/v), seguido de la adición de hexano y solución al 10 % de sulfato sódico y el análisis de la capa superior mediante HPLC.

Después de obtener el grado deseado de isomerización y la composición de xantofilas con un contenido de trans-luteína típicamente de aproximadamente un 85 %, la mezcla de reacción se diluye con agua y se agita bien a temperatura ambiente para obtener una capa oleosa de color amarillo que contiene xantofilas en forma libre asociadas con ácido graso, jabones e impurezas.

- Después de transferir esta capa oleosa a un embudo separador, se añade acetato de etilo y se extraen las xantofilas. La capa de acetato de etilo se lava dos veces con un volumen igual de agua desionizada. Por lo tanto, los ácidos grasos y los materiales jabonosos se eliminan en el agua, que después se desecha. El extracto de acetato de etilo se concentra mediante destilación del disolvente a presión reducida para recuperar el acetato de etilo y el concentrado de xantofila bruto.

La composición del concentrado de xantofila se somete a purificación mediante agitación con hexano a temperatura ambiente durante una hora, seguido de filtración. La masa de xantofilas se lava adicionalmente con etanol y los cristales de color naranja resultantes se secan al vacío a temperatura ambiente durante 72 horas.

Se muestra que la composición del producto de xantofila purificado consiste en aproximadamente un 80 a 90 % de xantofilas totales en peso, mediante análisis espectrofotométrico, y la composición de carotenoides de las xantofilas un 80 a 85 % de trans-luteína y normalmente aproximadamente 15 a 20 % de isómeros de zeaxantina, y, a veces, de tan solo aproximadamente 11,5 % mediante análisis HPLC con columna Cosmosil 5 SL-11 250 4.61 i.d. 5 m, Nacali Tesque co. Ltd. Kyoto, Japón, con acetona: n-hexano (1:9) a un caudal de 1 ml/min. usando una bomba

Hitachi L 6200 y un detector L-4250 UV-Vis fijado a 450 nm. La HPLC quiral se realizó para separación y cuantificación de la (R,R)-zeaxantina y la (R,S)-zeaxantina (en conjunto denominados en el presente documento isómeros de zeaxantina), usando Sumichiral OA-2000.

5 La composición de la presente invención contiene al menos 80 % en peso de luteína, derivada de extracto de planta/oleoresina que contiene xantofilas/ésteres de xantofilas y su seguridad ha sido bien establecida (Kuzhuvelil Bhaskarannair Harikumar et al, Toxicity Profile of Lutein a Lutein Ester Isolated From Marigold Flowers (Tagetes erecta), International Journal of Toxicology, Vol. 27, n.º 1, 1-9 (2008). La composición restante consiste en (R,R)-zeaxantina, que se extrae junto con la luteína y su seguridad se ha establecido junto con la de la luteína en el estudio anterior. El resto de la composición comprende el isómero (R,S) de zeaxantina, que también se forma a partir de la luteína. Adicionalmente, el proceso para preparar la composición de la presente invención se lleva a cabo conforme a las condiciones de las BPFc (buenas prácticas de fabricación), El proceso se lleva a cabo siguiendo las guías ISO 22000 y monitorizándose la seguridad alimentaria mediante HAACP (Análisis de riesgos y puntos de control críticos) como se describe a continuación.

15 Por lo tanto, la composición de la presente invención cumple todos los requisitos de seguridad y puede considerarse segura para el consumo humano. Como se explica en los párrafos anteriores, el isómero (R,S) de la zeaxantina está presente en la mácula y se forma mediante la acción de enzimas en el cuerpo en la luteína.

20 Por lo tanto, la composición de la presente invención que comprende trans-luteína, (R,R)-zeaxantina y (R,S)-zeaxantina es segura para el consumo humano.

Los detalles de la invención se dan en los siguientes ejemplos que se proporcionan para ilustrar la invención y, por lo tanto, no deben considerarse limitativos del alcance de la presente invención.

25 **Ejemplo 1**

La oleoresina de caléndula (100,3 g) que contiene un contenido de 135,40 g/kg de xantofilas (mediante un método espectrofotométrico) se mezcló con 50 g de hidróxido de potasio disueltos en 50 ml de 1-propanol. La mezcla de reacción se calentó y se mantuvo a 95 °C durante un periodo de 2 horas. Durante la etapa de reacción se tomó la muestra para análisis del contenido de trans-luteína y de zeaxantina usando HPLC. La masa de la reacción se agitó con 500 ml de agua destilada a temperatura ambiente. La mezcla se suspendió en un embudo separador y se extrajo con un volumen igual de acetato de etilo. Este ejercicio se realizó 5 veces. Se recogió la capa de acetato de etilo y se lavó con agua destilada para eliminar el exceso de álcali, los materiales jabonosos y otras impurezas solubles en agua. La capa de acetato de etilo se separó mediante destilación a presión reducida para obtener 72,10 g del extracto bruto saponificado.

Este extracto bruto (72 g) obtenido como se ha descrito anteriormente se sometió a purificación agitando con 360 ml de hexano a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido de filtración. Se obtuvieron 26,20 g húmedos de un precipitado, que se lavó con 262 ml de etanol a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido de filtración. Los cristales de color naranja resultantes se secaron al vacío a temperatura ambiente durante 72 horas y se almacenaron en atmósfera de nitrógeno.

El rendimiento de la composición de xantofila fue de 10,40 g con un contenido de xantofila del 83,29 % en peso (determinado mediante espectrofotometría UV/Vis). La composición del producto fue 80,80 % de trans-luteína y 19,2 % de isómeros de zeaxantina determinada mediante análisis HPLC. El análisis de HPLC quiral (Columna Sumichiral OA-2000; disolvente de n-hexano:cloroforno (48:8) mostró 46,3 % de (R,R)-zeaxantina y 53,7 % de (R,S)-zeaxantina.

## 50 **Ejemplo 2**

La oleoresina de caléndula (50 g) que contiene 124,10 g/kg de contenido de xantofilas (mediante método espectrofotométrico) se mezcló con 25 g de hidróxido potásico disuelto en 25 ml de 1-propanol). La mezcla de reacción se calentó y se mantuvo a 95 °C durante un periodo de 1 hora. Durante la etapa de reacción se tomó la muestra para el análisis del contenido de trans-luteína y zeaxantina usando HPLC. La masa de la reacción obtenida se agitó con 250 ml de agua destilada a temperatura ambiente. La mezcla se suspendió en un embudo separador y se extrajo con un volumen igual de acetato de etilo. Este ejercicio se repitió 5 veces. Se recogió la capa de acetato de etilo y se lavó con agua destilada para eliminar el exceso de álcali, los materiales jabonosos y otras impurezas solubles en agua. La capa de acetato de etilo se separó mediante destilación a presión reducida para obtener 30 mg del extracto bruto saponificado.

Este extracto bruto (30 g) se sometió a purificación agitando con 150 ml de hexano a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido de filtración. Se obtuvieron 9 g del precipitado, que se lavó con 90 ml de etanol a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido de filtración. Los cristales de color naranja resultantes se secaron al vacío a temperatura ambiente durante 72 horas y se almacenaron en atmósfera de nitrógeno.

El rendimiento de la composición de xantofila fue de 4,30 g con un contenido de xantofila del 82,59 % en peso (determinado mediante espectrofotometría UV/Vis). La composición del producto fue 83,32 % de trans-luteína y 15,32 % de isómeros de zeaxantina determinada mediante análisis HPLC.

### 5 Ejemplo 3

La oleoresina de caléndula (50 g) que contiene 160,07 g/kg de contenido de xantofilas (mediante método espectrofotométrico) se mezcló con 25 g de hidróxido potásico disuelto en 25 ml de 1-propanol). La mezcla de reacción se calentó y se mantuvo a 95 °C durante un periodo de 2 horas. Durante la etapa de reacción se tomó la muestra para el análisis del contenido de trans-luteína y zeaxantina usando HPLC durante la etapa de reacción. La masa de la reacción obtenida se agitó con 250 ml de agua destilada a temperatura ambiente. La mezcla se suspendió en un embudo separador y se extrajo con un volumen igual de acetato de etilo. Este ejercicio se repitió 5 veces. Se recogió la capa de acetato de etilo y se lavó con agua destilada para eliminar el exceso de álcali, los materiales jabonosos y otras impurezas solubles en agua. La capa de acetato de etilo se separó mediante destilación a presión reducida para obtener 36 g del extracto bruto saponificado.

Este extracto bruto resultante (36,90 g) se sometió a purificación agitando con 185 ml de hexano a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido de filtración. Se obtuvieron 10,33 g del precipitado, que se lavó con 103 ml de etanol a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido de filtración. Los cristales de color naranja resultantes se secaron al vacío a temperatura ambiente durante 72 horas y se almacenaron en atmósfera de nitrógeno.

El rendimiento de la composición de xantofila fue de 7,02 g con un contenido de xantofila del 85,59 % en peso (determinado mediante espectrofotometría UV/Vis). La composición del producto fue 86,50 % de trans-luteína y 13,2% de isómeros de zeaxantina determinada mediante análisis HPLC.

### 25 Ejemplo 4

La oleoresina de caléndula (52 g) que contiene un contenido de 132,2 g/kg de xantofilas (mediante un método espectrofotométrico) se mezcló con 26 g de hidróxido de potasio disueltos en 26 ml de 1-propanol. La mezcla de reacción se calentó y se mantuvo a 95 °C durante un periodo de 1 hora. Durante la etapa de reacción se tomó la muestra para el análisis del contenido de trans-luteína y zeaxantina usando HPLC. La masa de la reacción obtenida se agitó con 250 ml de agua destilada a temperatura ambiente. La mezcla se suspendió en un embudo separador y se extrajo con un volumen igual de acetato de etilo. Este ejercicio se repitió 5 veces. Se recogió la capa de acetato de etilo y se lavó con agua destilada para eliminar el exceso de álcali, los materiales jabonosos y otras impurezas solubles en agua. La capa de acetato de etilo se separó mediante destilación a presión reducida para obtener 30,30 g del extracto bruto saponificado.

Este extracto bruto resultante (30,30 g) se sometió a purificación agitando con 150 ml de hexano a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido de filtración. El precipitado (8,00 g) obtenido se lavó con 80 ml de etanol a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido de filtración. Los cristales de color naranja resultantes se secaron al vacío a temperatura ambiente durante 72 horas y se almacenaron en atmósfera de nitrógeno.

El rendimiento de la composición de xantofila fue de 4,40 g con un contenido de xantofila del 81,50 % en peso (determinado mediante espectrofotometría UV/Vis). La composición del producto fue 86,64% de trans-luteína y 11,49 % de isómeros de zeaxantina y cantidades traza de otros carotenoides determinada mediante HPLC.

### Ventajas de la invención

- 50 1. La composición de xantofila contiene
  - (a) pigmentos maculares, tales como trans-luteína, (R,R)- zeaxantina y (R,S)- zeaxantina en una proporción específica.
  - 55 (b) al menos 80 % de xantofilas totales, de las cuales la trans-luteína es al menos un 80 % y siendo una porción restante de aproximadamente 15-20 % típicamente isómeros de zeaxantina (R,R) y (R,S)-zeaxantina, respectivamente.
- 60 2. La composición xantofila satisface las consideraciones normativas de seguridad, debido al uso de reactivos GRAS y, por tanto, seguros para el consumo humano y útiles para la nutrición y la atención sanitaria.
- 65 3. La composición de xantofila es un suplemento dietético de una fuente que contiene todos los pigmentos maculares esenciales que pueden ayudar en el mantenimiento de la salud ocular.
4. Muchos formuladores hoy en día requieren formas de principio activo donde la relación luteína: isómeros de zeaxantina es superior a 20:1, que es típica de la mayoría de los productos de extracto de caléndula. Con el fin de mejorar la relación de zeaxantina en sus productos terminados deben incorporarse fuentes complementarias

de zeaxantina, además de la fuente de luteína. En la presente invención, las tres xantofilas están presentes y, por lo tanto, no hay ningún requisito de adición de ninguna fuente complementaria.

5 5. Del mismo modo, algunos formuladores buscan las tres formas de carotenoides maculares, es decir, los 3 pigmentos que se ha descubierto que desempeñan un papel protector en la mácula de la retina, (es decir, luteína, (R,R)-zeaxantina, (R,S)-zeaxantina). En la actualidad, es difícil obtener los tres carotenoides de una fuente y, por tanto, con frecuencia los formuladores tienen que usar 3 ingredientes diferentes para fabricar una formulación equilibrada con los tres pigmentos maculares. Es deseable tener una composición que comprende trans-luteína y los dos isómeros de zeaxantina, (R,R)-zeaxantina y (R,S)-zeaxantina. No obstante, los formuladores han necesitado usar múltiples ingredientes de más de una fuente para obtener las tres xantofilas deseadas. La formulación en el presente documento supera este inconveniente.

10 6. Algunos formuladores buscan ingredientes donde la luteína:isómeros de zeaxantina están en la proporción de 5:1 (donde, además, (R,R)-zeaxantina, (R,S)-zeaxantina está en la proporción (1:1) para que hacer coincidir la proporción luteína:isómeros de zeaxantina en el pigmento macular.

15 7. El estudio **AREDS II** (estudio de enfermedades oculares relacionadas con la edad) realizado con 4.000 sujetos evaluó los efectos de la suplementación oral de dosis altas de xantofilas maculares (Es decir, luteína y zeaxantina) e incluyó la dosis de luteína:zeaxantina en la suplementación en la proporción 5:1 (10 mg de luteína:2 mg de zeaxantina). *ref:*[https://web.emmes.com/study/areds2/resources/areds2\\_mop.pdf](https://web.emmes.com/study/areds2/resources/areds2_mop.pdf). Cabe esperar que un solo ingrediente que pueda proporcionar luteína y zeaxantina en la proporción 5:1 puede ser de gran beneficio para los formuladores, que están esperando ansiosamente el resultado del ensayo **AREDS II**. En la actualidad, este objetivo se satisface usando varios ingredientes, lo que genera costes, esfuerzo y manipulación de muchos elementos de reserva.

20 25 8. La composición xantofila permitiría el desarrollo de una composición estandarizada con la proporción requerida de luteína: zeaxantina o luteína: (R,R)- zeaxantina :(R,S)- zeaxantina de una sola fuente.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de xantofilas que contiene pigmentos maculares que consisten en trans-luteína, isómeros de zeaxantina, es decir, (R,R)-zeaxantina y (R,S)-zeaxantina, derivados del extracto de planta/oleoresina que contiene xantofilas/ésteres de xantofilas que es segura para consumo humano y útil para nutrición y atención sanitaria, que comprende al menos un 80 % en peso de xantofilas totales, la relación de las cuales de trans-luteína e isómeros de zeaxantina está en el intervalo de 4:1 a 6:1 y estando la relación de los isómeros de zeaxantina en el intervalo de 80 a 20: 20 a 80.
- 10 2. Una composición de xantofila de acuerdo con la reivindicación 1, donde la composición contiene al menos un 85 % en peso de xantofilas totales, cuyo contenido de trans-luteína es de al menos 85 %.
- 15 3. Una composición de xantofila de acuerdo con la reivindicación 1, donde la composición contiene al menos un 85 % en peso de xantofilas totales, de las cuales al menos el 80 % en peso es trans-luteína, siendo el 15 % en peso restante isómeros de zeaxantina, es decir, (R,R)-zeaxantina y (R,S)-zeaxantina.
- 20 4. Un proceso para la preparación de una composición de xantofila que contiene pigmentos maculares que consisten en trans-luteína, isómeros de zeaxantina, en concreto, (R,R)-zeaxantina y (R,S)-zeaxantina derivados del extracto de planta/oleoresina que contiene xantofilas/ésteres de xantofilas que es seguro para el consumo humano y útil para aplicaciones de nutrición y atención sanitaria, que comprende:
- 25 (a) saponificar e isomerizar parcialmente de forma simultánea los ésteres de xantofila presentes en el extracto de planta/oleoresina que contiene ésteres de xantofilas mediante mezcla del extracto/oleoresina con solución alcalina de 1-propanol, estando la proporción de álcali y 1-propanol en el intervalo de 1:0,5 a 1:1 en peso/volumen, calentando la masa resultante a una temperatura en el intervalo de 70-100 °C, preferentemente a 95 °C durante un periodo en el intervalo de 1 a 5 horas para obtener un concentrado bruto saponificado/isomerizado;
- 30 (b) mezclar el concentrado bruto saponificado/isomerizado resultante obtenido en la etapa (a) con agua, estando la relación del concentrado y el agua usados en el intervalo de 1:2 a 1:3 en volumen/volumen, para formar una mezcla oleosa diluida;
- (c) extraer la mezcla oleosa diluida obtenida en la etapa (b) con acetato de etilo, estando la proporción de la mezcla oleosa y el acetato de etilo en el intervalo de 1:1,5 a 1:2 en volumen/volumen para conseguir un extracto que contenga la composición de xantofilas;
- 35 (d) evaporar la composición obtenida en la etapa (c) para eliminar el acetato de etilo;
- (e) purificar la composición resultante de la etapa (d) lavando primero con disolventes no polares y después polares, y filtrar;
- (f) secar la composición resultante al vacío a una temperatura en el intervalo de 40 a 45 °C durante un periodo que varía de 48 a 72 horas;
- 40 (g) si se desea, recuperar el acetato de etilo usado en la etapa (c) mediante métodos convencionales y, si se requiere, reutilizar; y
- (h) almacenar la composición resultante en una atmósfera inerte a -20 °C.
- 45 5. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 4, donde el extracto de planta/oleoresina que contiene ésteres de xantofila utilizado se deriva de flores de caléndula.
6. Un proceso de acuerdo con las reivindicaciones 4 y 5, donde el disolvente no polar usado en la etapa (e) se selecciona de un disolvente de hidrocarburo que se selecciona de pentano, hexano y heptano, preferentemente hexano, y el disolvente polar usado se selecciona de un alcohol alifático inferior.