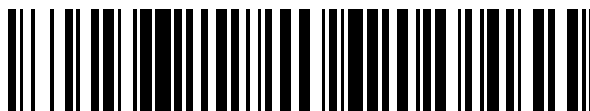


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 562**

51 Int. Cl.:

A23K 50/40 (2006.01)

A23K 20/179 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.01.2012 PCT/US2012/020852**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.07.2012 WO12097018**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.2012 E 12701300 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 2663198**

54 Título: **Composiciones relacionadas con los carotenoides**

30 Prioridad:

14.01.2011 US 201161432627 P

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

13.05.2019

73 Titular/es:

IAMS EUROPE B.V. (100.0%)

Vosmatenweg 4

7742 PB Coevorden, NL

72 Inventor/es:

ZHANG, JIN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 712 562 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

Composiciones relacionadas con los carotenoides

La presente invención se refiere a composiciones para alimento de mascotas, que utilizan carotenoides.

Antecedentes

5 La biodisponibilidad de los carotenoides de las dietas puede verse afectada por un número complejo de factores, tales como las propiedades fisicoquímicas de los diversos carotenoides (libre frente a esterificado; hidrocarburo frente a oxigenado); su estado físico (cristales frente a proteínas unidas frente a solubilizados en aceite); factores dietéticos, por ejemplo cantidades y tipos de grasa y fibra; estado nutricional y fisiológico del sujeto, y genotipo. Además, las interacciones de los carotenoides a nivel intestinal pueden reducir la absorción de cualquiera de los carotenoides. La

10 competencia por la absorción puede tener lugar al nivel de la incorporación micelar, absorción intestinal, transporte linfático o a más de un nivel. Por ejemplo, se ha publicado que el beta-caroteno reduce la absorción de luteína, mientras que la luteína hizo disminuir la absorción de beta-caroteno en algunos sujetos humanos, pero aumentar en otros (véase Kostic D, White WS, Olson JA. Absorción intestinal, aclaramiento del suero e interacciones entre la luteína y el β -caroteno cuando se administra a adultos humanos en dosis orales separadas o combinadas. Am J Clin Nutr. 1995; 62: 604 - 610). En otro estudio, la luteína afectó a la absorción de beta-caroteno en sujetos humanos, pero no afectó a la secreción de ésteres de retinilo en quilomicrones (véase van den Berg H, van Vliet T. Efecto de dosis orales únicas simultáneas de β -caroteno con luteína o licopeno sobre las respuestas de β -caroteno y retinil éster en la fracción de hombres rica en triglicéridos. Am J Clin Nutr 1998; 68: 82 - 89). En cambio, la absorción de beta-caroteno no se vio

15 afectada por el licopeno en estos sujetos. Publicaciones adicionales de interacciones entre carotenoides puros que afectan a su apariencia postprandial en plasma de personas y animales han sido revisadas por Van den Berg (véase van den Berg H., Interacciones de carotenoides. Nutr Rev. 1999; 57: 1 - 10). Tyssandier et al. informaron que la absorción de beta-caroteno, luteína y licopeno de una sola verdura era mayor cuando el alimento se administraba solo, que cuando se administraba junto con una segunda verdura rica en carotenoides o el carotenoide purificado que se enriquecía en el segundo vegetal (véanse Tyssandier V, Reboul E, Dumas J, Bouteloup-Demange C, Armand M, Marcand J, Sallas M, Borel P. Procesamiento de carotenoides vegetales presentes en el estómago humano y el duodeno. Am J Physiol (Gastrointest Liver Physiol). 2003; 284: G913 - G922).

El documento US 5.937.790 se refiere a un agente anti-estrés para animales, y a un método para reducir el estrés en animales.

30 El documento JP 54 070995, de acuerdo con la traducción inglesa del resumen, se refiere a un pienso destinado al uso en la cría de la dorada roja, para mejorar su color.

El documento WO 2005/009422 A1 se refiere a formulaciones anti-inflamatorias.

El documento DE 10 2007 001 156 se refiere al uso de un alimento que contiene un aditivo para colorear la yema de huevo.

35 El documento US 2003/0206972 A1 se refiere a composiciones que contienen carotenoides y tocotrienoles y que tienen un efecto antioxidante sinérgico.

El documento US 2008/0124391 A1 se refiere a una composición de suplemento dietético de algas y extracto de algas.

El documento US 2009/0220640 A1 se refiere a un método de suplementar a los animales con carotenoides bebiendo agua.

40 Los estudios iniciales han informado de que tanto el animal canino como el felino doméstico son incapaces de absorber beta-caroteno de la dieta (Goodwin T. Carotenoides de mamíferos. En: Goodwin TW, ed. La bioquímica comparativa de los carotenoides. Londres: Chapman y Hall Ltd., 1952; 229 - 269). Recientemente, varios estudios sistemáticos indicaron que los perros y los gatos pueden absorber beta-caroteno y luteína (Weng BC, Chew BP, Park JS, Wong TS, Combs RL, Hayek MG, Reinhart GA. Absorción de β -caroteno por el plasma sanguíneo y leucocitos en perros FASEB J 1997; 11: A180. Kim HW, Chew BP, Wong TS, Park JS, Weng BB, Byrne KM, Hayek MG, Reinhart GA. La luteína dietética estimula la respuesta inmunitaria en animales caninos. Vet Immunol Immunopathol. 23 de mayo 2000; 74 (3 - 4): 315 - 27. Chew BP, Weng BC, Park JS, Wong TS, Combs RL, Hayek MG, Reinhart GA. Absorción de β -caroteno por el plasma sanguíneo y linfocitos en gatos. FASEB J 1997; 11: A447. Kim, HW, Chew, BP, Wong, TS, Park, JS, Weng, B. C, Byrne, KM, Hayek, MG y Reinhart, GA Modulación de las respuestas inmunitarias humorales y mediadas por células mediante luteína dietética en gatos. Vet. Immunol. Immunopath. 2000, 73: 331 - 341). Sin embargo, se desconoce cómo los carotenoides interactúan entre sí en perros y gatos. Se desea un efecto beneficioso entre los carotenoides si se usa en animales de compañía ya que se cree que cada carotenoide individual tiene un papel potencial en la contribución a la salud de perros y gatos. Por tanto, se desea un producto que combine los carotenoides de una manera que afecte positivamente a la absorción de esos carotenoides. Tal producto podría entonces presentar efectos más beneficiosos en el animal.

Resumen

La invención se define en la reivindicación 1.

Descripción detallada

Definiciones

- 5 Como se usa en el presente documento, se entiende que los artículos que incluyen "el" y "un", cuando se usan en una reivindicación o en la especificación, significan una o más cosas de lo que se reivindica o se describe.
- Como se usa en el presente documento, los términos "incluyen", "incluye", y "que incluye" pretenden ser no limitantes.
- Como se usa en este documento, el término "pluralidad" significa más de uno.
- 10 Como se usa en este documento, los términos "animal" o "mascota" significan un animal doméstico que incluye, pero sin limitarse a ellos, perros domésticos (caninos), gatos (felinos), caballos, vacas, hurones, conejos, cerdos, ratas, ratones, jerbos, hámsters y similares. Los perros domésticos y los gatos domésticos son ejemplos particulares de mascotas y se mencionan aquí como "animales de compañía". Se ha de entender que a lo largo de esta descripción, cuando se utiliza el término animal, mascota o animal de compañía, el animal, mascota o animal de compañía se encuentra en un estado de ausencia de enfermedad, a menos que se indique otra cosa.
- 15 Tal como se usa en el presente documento, los términos "alimento para animales", "composiciones de alimento para animales", "croqueta de alimento para animales", "alimento para mascotas" o "composición de alimento para mascotas" significan todos ellos una composición destinada a ser ingerida por un animal doméstico. Los alimentos para mascotas pueden incluir, sin ser limitantes, composiciones nutricionalmente equilibradas adecuadas para la alimentación diaria, así como alimentos húmedos, suplementos y/o golosinas, que pueden o no ser nutricionalmente equilibrados.
- 20 Como se usa en el presente documento, la expresión "nutricionalmente equilibrado" significa que una composición, como el alimento para mascotas, ha conocido los nutrientes que se requieren para mantener la vida, en cantidades y proporciones adecuadas según las recomendaciones de las autoridades reconocidas, incluidas las agencias gubernamentales tales como, entre otras, el United States Food and Drug Administration's Center for Veterinarian Medicine, la American Feed Control Officials Incorporated, en el campo de la nutrición de mascotas, excepto para la necesidad adicional de agua.
- 25 Como se usa en el presente documento, la expresión "administración oral" con respecto al animal de compañía significa que el animal ingiere o un ser humano se dirige a alimentar, o alimenta, al animal una o más composiciones del presente documento.
- 30 Como se usa en este documento, el término "absorción" significa, como en el caso de un componente dietético (como los carotenoides que se describen en este documento) de los alimentos, que el componente dietético se digiere en el espacio intestinal gástrico y pasa a los vasos sanguíneos de la pared del intestino a través del proceso de difusión, por ejemplo en un animal de compañía.
- 35 Como se usa en este documento, el término "biodisponibilidad" significa la absorción de un componente dietético de los alimentos para su utilización o almacenamiento en el cuerpo. Los componentes dietéticos ingeridos pero no liberados durante el proceso digestivo para su absorción son de un valor nutritivo entre limitado y nulo. El suministro de componentes dietéticos ingeridos y sus metabolitos bioactivos a los tejidos diana depende de la absorción del intestino delgado. Por tanto, la biodisponibilidad también puede considerarse la absorción relativa de un componente dietético del alimento.
- 40 Como se usa en este documento, los términos absorción y biodisponibilidad pueden ser intercambiables.
- Debe entenderse que cada limitación numérica máxima que se da a lo largo de esta especificación incluye cada limitación numérica inferior, como si dichas limitaciones numéricas inferiores estuvieran expresamente escritas en este documento. Cada limitación numérica mínima dada a lo largo de esta especificación incluirá cada limitación numérica superior, como si tales limitaciones numéricas superiores estuvieran expresamente escritas en este documento. Cada rango numérico dado a lo largo de esta especificación incluirá cada rango numérico más estrecho que caiga dentro de un rango numérico más amplio, como si dichos rangos numéricos más estrechos estuvieran expresamente escritos en el presente texto.
- 45
- 50 Todas las listas de elementos como, por ejemplo, listas de ingredientes, están destinadas y deben interpretarse como grupos de Markush. Por tanto, todas las listas se pueden leer e interpretar como elementos "seleccionados entre el grupo que consiste en " ... lista de elementos ..." y combinaciones y mezclas de los mismos".

En el presente documento se hace referencia a nombres comerciales para componentes que incluyen diversos ingredientes utilizados en realizaciones de la invención. Los inventores aquí mencionados no pretenden estar limitados por materiales bajo un cierto nombre comercial. Los materiales equivalentes (por ejemplo, los obtenidos de una fuente diferente bajo un nombre o número de referencia diferente) a los referenciados por el nombre comercial, pueden sustituirse y utilizarse en las descripciones de este documento.

Los procesos, métodos, composiciones y aparatos en el presente documento pueden comprender, consistir esencialmente en, o consistir en cualquiera de las características o realizaciones que se describen en el presente documento.

En la descripción de las diversas realizaciones de la exposición, se describen diversas realizaciones o características individuales. Como resultará evidente para un profesional con una experiencia normal en la técnica, son posibles todas las combinaciones de tales realizaciones y características, y pueden dar como resultado ejecuciones preferidas de la descripción. Si bien se han ilustrado y descrito varias realizaciones y características individuales de la invención, se pueden hacer otros cambios y modificaciones sin apartarse del alcance de la invención. Como también será evidente, todas las combinaciones de las realizaciones y características que se enseñan en la descripción anterior son posibles y pueden dar como resultado ejecuciones preferidas de la invención.

Realizaciones de la invención

La invención se refiere a composiciones como se definen en las reivindicaciones anexas, que aumentan la biodisponibilidad de los carotenoides de la dieta. Se describen aquí otros métodos que aumentan la biodisponibilidad de los carotenoides de la dieta.

Como se describe en el presente texto, la absorción de un componente dietético de los alimentos, tal como el beta-caroteno, la luteína y/o la astaxantina, significa que el componente dietético se digiere en el espacio intestinal gástrico y pasa a los vasos sanguíneos de la pared del intestino a través del proceso de difusión. La absorción se usa en el presente documento indistintamente con la biodisponibilidad, que generalmente significa la absorción de un componente dietético del alimento para su utilización o almacenamiento en el cuerpo. Los componentes dietéticos ingeridos pero no liberados para la absorción durante el proceso digestivo son de un valor nutricional de limitado a nulo. El suministro de componentes dietéticos ingeridos y sus metabolitos bioactivos a los tejidos diana dependen de la absorción del intestino delgado. Por tanto, la biodisponibilidad puede también considerarse la absorción relativa de un componente dietético del alimento.

Los carotenoides son una clase de hidrocarburos que consta de ocho unidades isoprenoides unidas en un patrón de cabeza a cola, excepto en el centro, para dar simetría a la molécula de modo que los dos grupos metilo centrales estén en una relación posicional 1,6 y los restantes grupos metilo no terminales estén en una relación posicional 1,5. Basándose en esta estructura, se utiliza un sistema de numeración semisistemático, y los carotenoides se nombran como un derivado de su compuesto parental. Las letras griegas se utilizan para describir los grupos terminales de la estructura en el sistema de la IUPAC. La posición de hidrogenación y sustitución de grupos se indica con prefijos y sufijos. La mayoría de los carotenoides se derivan de una cadena de polieno de 40 carbonos, que generalmente se considera como la columna vertebral de la molécula. Esta cadena puede ser terminada por grupos terminales cíclicos (anillos) y puede complementarse con grupos funcionales que contienen oxígeno. Todos los carotenoides pueden considerarse como derivados del licopeno (C₄₀H₅₆) por reacciones que implican: (1) hidrogenación, (2) deshidrogenación, (3) ciclación, (4) inserción de oxígeno, (5) migración de doble enlace, (6) migración de metilo, (7) alargamiento de la cadena, y (8) acortamiento de la cadena. Basándose en su estructura química, los carotenoides se clasifican en dos grupos: hidrocarburos conocidos comúnmente como carotenos que están constituidos por carbono e hidrógeno; y oxicarotenoides o xantofilas que tienen carbono, hidrógeno y, además, oxígeno. Los ejemplos de carotenos son α -caroteno, β -caroteno, γ -caroteno, δ -caroteno, ϵ -caroteno, ζ -caroteno, licopeno, neurosporeno, fitoeno y fitoflueno. Los carotenoides oxigenados o xantofilas pueden clasificarse además como aquellos que contienen solamente un grupo hidroxilo (denominados aquí hidroxil xantofilas), como la luteína, la zeaxantina, la criptoxantina, la anteraxantina, la neoxantina y la violaxantina; y aquellos que tienen un grupo ceto con o sin el grupo hidroxilo (denominado aquí como ceto-xantofilas), como la astaxantina, la cantaxantina y la fucoxantina. Los carotenoides sin un grupo ceto se denominan no ceto carotenoides en el presente documento (como el beta-caroteno y la luteína), mientras que los carotenoides que tienen un grupo ceto se denominan ceto-carotenoides en el presente documento (como la astaxantina).

La astaxantina es un ceto-carotenoide y se clasifica como una ceto-xantofila. Como muchos carotenoides, es un pigmento vistoso, soluble en lípidos. La astaxantina se encuentra en las microalgas, la levadura, el salmón, la trucha, el krill, el camarón, el cangrejo de río, los crustáceos y en las plumas de algunas aves. La producción comercial de astaxantina proviene de fuentes naturales y sintéticas. La astaxantina sintética se produce como astaxantina libre (no esterificada) en una mezcla de estereoisómeros: los estereoisómeros (3R, 3'R), (3R, 3'S), y (3S, 3'S) se presentan en una proporción de 1:2:1. La astaxantina natural, por otra parte, suele estar esterificada y predominantemente de configuración (3S, 3'S) o, con menor frecuencia, principalmente (3R, 3'R). Actualmente, la principal fuente natural de astaxantina es la microalga *Haematococcus pluvialis*. En *Haematococcus pluvialis*, la astaxantina aparece como el

estereoisómero 3S, 3'S y principalmente como monoésteres (> 90%), con diésteres que comprenden aproximadamente el 8% y la molécula libre aproximadamente el 1% (Renström et al. 1981). Otra fuente natural es de la levadura *Phaffia*. La levadura *Phaffia xanthophyllomyces dendrorhous* presenta un 100%, o casi un 100%, de astaxantina libre en 3R, 3'R y en forma no esterificada. Una fuente adecuada de astaxantina libre se describe en <http://www.naturxan.com/products/aquasta/natural-vs-synthetic.html>. Como se usa en este documento, cuando el término astaxantina se usa como parte de una composición, también puede significar astaxantina-éster.

El beta-caroteno, un carotenoide hidrocarbonado natural, se puede encontrar en los vegetales de raíz de color naranja, como las zanahorias y los ñames, y en los vegetales de hojas verdes como las espinacas, col rizada y hojas de batata. Entre otras fuentes, también está disponible comercialmente en formas sintéticas o naturales a partir de aceite de palma, algas u hongos. Para la mayoría de los mamíferos, el beta-caroteno es un precursor de la vitamina A, lo que significa que los mamíferos pueden convertir el beta-caroteno en vitamina A. Los gatos son una excepción notable porque tienen una capacidad limitada para hacerlo. El beta-caroteno es un antioxidante además de su actividad de provitamina A. Se puede usar para los seres humanos como complemento alimenticio para prevenir el cáncer y las enfermedades del corazón, y puede aumentar la inmunidad y apoyar la visión. También se usa en alimentos para mascotas como antioxidante para proporcionar beneficios inmunitarios, entre otros.

La luteína, un oxicarotenoide natural que pertenece a la clase de la xantofila, se puede encontrar en vegetales de hojas verdes como la espinaca y la col rizada. Entre otras fuentes, también está disponible comercialmente de forma sintética o natural a partir de extracto de caléndula, harina de gluten de maíz y aceite de grano de maíz. La luteína es conocida por su beneficio para la salud oftalmológica. Se encontró que se concentra en la mácula y que ayuda a proteger el ojo del estrés oxidativo y la luz de alta energía. La luteína también proporciona beneficios para la salud cardiovascular y la salud cutánea. La luteína se ha utilizado en productos farmacéuticos, nutracéuticos, alimentos, alimentos para mascotas, alimentos para animales y alimentos para peces. También se usa en alimentos para mascotas como antioxidante para proporcionar beneficios inmunitarios, entre otros.

Como se usa en este documento, cuando se describen cantidades o proporciones de beta-caroteno, luteína y astaxantina, la cantidad o proporción incluye las cantidades totales de estos ingredientes, incluyendo todos los isómeros y formas de estos ingredientes. Por ejemplo, las formas *cis* y *trans* del beta-caroteno están incluidas en las cantidades de beta-caroteno.

Además, los carotenoides son un subconjunto de antioxidantes, que son pigmentos de origen natural que comúnmente incluyen beta-caroteno, luteína y astaxantina, entre otros. En los seres humanos, los carotenoides derivados del consumo de frutas y verduras se han relacionado con un menor riesgo de enfermedad coronaria y algunos tipos de cáncer (véase Van Poppel G. Evidencia epidemiológica de beta-caroteno en la prevención del cáncer y la enfermedad cardiovascular. *Eur. J. Clin. Nutr.* 1996; 50: S57 - S61). Se ha encontrado también que los carotenoides son beneficiosos para los animales de compañía, como los gatos y los perros.

En perros, se ha encontrado que el beta-caroteno y la luteína en la dieta hacen aumentar las respuestas inmunitarias humorales y mediadas por células en beagles (véase Chew BP, Park JS, Wong TS, Weng BC, Kim HW, Byrne KM, Hayek MG, Reinhart GA. El papel del beta-caroteno de la dieta en la modulación de las respuestas inmunitarias humorales y mediadas por células en perros. *FASEB J* 12: A967, 1998 y Kim HW, Chew BP, Wong TS, Park JS, Weng BC, Byrne KM, Hayek MG. Modulación de la inmunidad mediada por células por la luteína dietética en perros. *FASEB J* 1998; 12: A966). Se ha encontrado que la astaxantina muestra beneficios inmunomoduladores en los perros, incluyendo un aumento de las respuestas inmunitarias humorales y mediadas por células; reducción del daño en el ADN y la inflamación en perros (véase la publicación de patente de Estados Unidos nº 2004/0151761).

En gatos, se ha encontrado que la luteína en la dieta hace aumentar la respuesta de la DTH a antígenos específicos y no específicos (Park, JS, Chew, BP, Hayek, MG, Massimino, S. y Reinhart, GA (2004). El beta-caroteno de la dieta potencia la respuesta inmunitaria mediada por células y humoral en gatos. *FASEB J.* 18: A53). Además, se ha encontrado que los gatos alimentados con astaxantina muestran respuestas inmunitarias humorales y mediadas por células mejoradas (véase la publicación de patente de Estados Unidos nº 20040151761 y Chew BP, Park JS, Hayek MG, Reinhart GA. La astaxantina de la dieta estimula la respuesta inmunitaria mediada por células y humoral en gatos. *FASEB J* 2003).

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden los carotenoides astaxantina, beta-caroteno y luteína, como se define en la reivindicación 1.

Como se describe en este documento, estos carotenoides específicos proporcionan a los animales de compañía beneficios para la salud. Además, se ha determinado que las combinaciones particulares de los carotenoides pueden incrementar la absorción o la biodisponibilidad de los carotenoides.

Las composiciones usadas aquí son composiciones de alimentación de mascotas. Estas incluirán de manera ventajosa los alimentos destinados a satisfacer los requisitos dietéticos necesarios, así como golosinas (por ejemplo, galletas) u otros complementos alimenticios. La composición de la presente invención puede ser una composición de alimento para mascotas tal como una composición seca (por ejemplo, croquetas), una composición semihúmeda, una

composición húmeda o cualquier mezcla de las mismas. Alternativa o adicionalmente, la composición puede ser un suplemento, como una salsa, agua potable, yogur, polvo, suspensión, goma, golosinas (por ejemplo, galletas), polvo para espolvorear, o cualquier otra forma de suministro. Como ejemplo, en una realización la composición puede ser nutricionalmente equilibrada y puede ser una croqueta nutricionalmente equilibrada.

5 Las composiciones descritas en el presente documento pueden usarse como suplemento a los requerimientos dietéticos ordinarios o pueden servir como principal alimento para el animal de compañía (y, como tales, los suplementos o alimentos pueden ser nutricionalmente equilibrados). La administración puede realizarse según sea necesario o a voluntad, por ejemplo una vez al mes, una vez a la semana o una vez al día (incluidas varias veces al día). Cuando se utiliza como suplemento a los requerimientos dietéticos ordinarios, la composición puede administrarse directamente al mamífero o, en caso contrario, ponerse en contacto o mezclarse con el pienso diario o el alimento o el agua. Cuando se utiliza como alimento o pienso diario, la forma de administración será bien conocida por los expertos en la materia.

15 Las composiciones usadas en el presente documento pueden comprender uno o más componentes adicionales. En una realización, las composiciones pueden comprender, sobre la base de materia seca, de 10% a 90% de proteína cruda, alternativamente de 20% a 50% de proteína cruda, alternativamente de 20% a 40% de proteína cruda, en peso de la composición, o alternativamente de 20% a 35% de proteína cruda, en peso de la composición. El material de proteína cruda puede comprender proteínas de origen vegetal como la soja, cereales (maíz, trigo, etc.), semilla de algodón y maní, o proteínas de origen animal como la caseína, la albúmina y la proteína de carne. Los ejemplos no limitantes de proteína de carne útiles en el presente documento incluyen una fuente de proteína seleccionada entre el grupo que consiste en res, cerdo, cordero, pollo, pescado y mezclas de los mismos.

Además, las composiciones pueden comprender, sobre una base de materia seca, de 5% a 40% de grasa, alternativamente de 10% a 35% de grasa, en peso de la composición.

25 Las realizaciones relacionadas con las composiciones de la invención pueden comprender además una fuente de carbohidratos. En una realización, las composiciones pueden comprender de 35% en peso de la composición hasta 50% en peso de la composición de una fuente de carbohidratos. En otras realizaciones, la composición puede comprender de 35% a 45%, en peso de la composición, o de aproximadamente 40% hasta 50%, en peso de la composición, de una fuente de carbohidratos. Los granos o cereales tales como el arroz, el maíz, el milo, el sorgo, la cebada, el trigo y similares son fuentes ilustrativas de carbohidratos.

30 Las composiciones pueden contener también otros materiales tales como, pero sin limitarse a ellos, suero seco y otros subproductos lácteos, pulpa de remolacha, celulosa, fibra, aceite de pescado, lino, vitaminas, minerales, sabores, antioxidantes y taurina.

35 Las composiciones también pueden contener otros ingredientes opcionales. Los ingredientes opcionales pueden incluir componentes Probióticos (Bifidobacterias y/o Lactobacillus) y componentes Prebióticos (fructooligosacáridos). Los ejemplos y cantidades de componentes probióticos y componentes prebióticos que pueden incluirse se describen en la publicación de los Estados Unidos nº 2005/0158294, por ejemplo. Otros ingredientes opcionales que se pueden incluir son ácidos grasos omega 6 y omega 3, carnitina, hexametáfosfato, glucosamina y sulfato de condroitina. Las composiciones también pueden comprender al menos una fuente de fibra para mejorar la salud gastrointestinal. Dichas fuentes de fibra pueden comprender, por ejemplo, al menos una fibra moderadamente fermentable. Se ha descrito anteriormente que la fibra moderadamente fermentable proporciona un beneficio al sistema inmunológico de un animal de compañía. También pueden incorporarse en la composición fibras moderadamente fermentables u otras composiciones conocidas por los expertos en la técnica que proporcionan una composición prebiótica para mejorar el crecimiento de microorganismos probióticos dentro del intestino para ayudar a mejorar el beneficio proporcionado por la presente invención al sistema inmunológico de un animal. Además, se pueden agregar a la composición microorganismos probióticos, como las especies Lactobacillus o Bifidobacterium, por ejemplo.

45 Otros ingredientes opcionales pueden incluir té, como té verde, té negro, té oolong o té blanco; ácido alfalipoico y sus sales; hierbas y especias, y aceites esenciales derivados de hierbas y especias; la vitamina E de 100 mg a 2000 mg por kg de composición; vitamina C (ácido ascórbico); selenio; extracto de romero; isoflavonas; cromo; frutas y vegetales.

50 Los métodos descritos en el presente texto comprenden administrar por vía oral (es decir, mediante ingestión) una composición de la presente invención a un animal de compañía y, lo más preferiblemente, a un perro o un gato domésticos. Si se dirige a un ser humano para alimentar la composición, tal dirección puede ser la que instruye y/o informa al ser humano de que el uso de la composición puede proporcionar un beneficio, por ejemplo la atenuación de una inflamación o la mejoría de la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, dicha dirección puede ser una dirección oral (por ejemplo, a través de instrucciones verbales de, por ejemplo, un médico, un veterinario u otro profesional de la salud; o medios de radio o televisión), es decir, publicidad, o instrucciones escritas por parte de un médico, veterinario u otro profesional de la salud, por ejemplo, guiones, o profesionales de ventas u organización, por ejemplo, a través de folletos de marketing, folletos u otra parafernalia instructiva, otros medios escritos, por ejemplo Internet, correo electrónico u otros medios relacionados con ordenadores; y/o envases asociados con la composición, por ejemplo una

- etiqueta presente en un recipiente que contiene la composición. Como se usa en el presente documento, "escrito" significa a través de palabras, imágenes, símbolos y/u otros descriptores visibles. Dicha información no necesita utilizar las palabras reales empleadas en este documento, por ejemplo, "atenuar", "inflamación", "mejorar", "inmunitario", "respuesta" o similares, sino que más bien se considera dentro del alcance de esta invención el uso de palabras, imágenes, símbolos y similares que transmitan el mismo significado o uno similar.
- La cantidad de composición utilizada puede depender de diversos factores que incluyen la condición y/o la edad del animal de compañía, la calidad de la composición de alimento o el suplemento para mascotas (cuando corresponda), y el tamaño o la raza del animal de compañía (en su caso).
- Así pues, la presente invención se refiere a una composición de alimento para mascotas como se define en la reivindicación 1.
- Se describen composiciones que incluyen beta-caroteno, luteína y astaxantina, en diversas cantidades, combinaciones y/o proporciones. Así pues, estos componentes pueden constituir la cantidad total de carotenoides por peso de la composición global.
- Por ejemplo, la cantidad total de carotenoides, en peso de la composición, es 0,0025% para una composición de alimento para mascotas equilibrada nutricionalmente. En otro ejemplo, los carotenoides totales, en peso de la composición, son de 0,0005% a 0,025% para una composición de alimento para mascotas nutricionalmente equilibrada. En otro ejemplo, el total de carotenoides, en peso de la composición, es de 0,0001% a 0,01% para una composición de alimento para mascotas nutricionalmente equilibrada. En otro ejemplo, los carotenoides totales, en peso de la composición, son de 0,001% a 0,01% para una composición de alimento para mascotas nutricionalmente equilibrada. En otro ejemplo, los carotenoides totales, en peso de la composición, son de 0,001% a 0,005% para una composición de alimento para mascotas nutricionalmente equilibrada. En otro ejemplo, los carotenoides totales, en peso de la composición, son de 0,002% a 0,003% para una composición de alimento para mascotas nutricionalmente equilibrada.
- En otro ejemplo, los carotenoides totales en peso de la composición pueden ser 0,0525% para un suplemento, tal como una galleta. En otro ejemplo, los carotenoides totales, en peso de la composición, son de 0,01% a aproximadamente 0,1% para un suplemento, tal como una galleta. En otro ejemplo, los carotenoides totales, en peso de la composición, son de 0,02% a aproximadamente 0,08% para un suplemento, tal como una galleta. En otro ejemplo, los carotenoides totales, en peso de la composición, son de 0,04% a 0,06% para un suplemento, tal como una galleta.
- En un ejemplo, el beta-caroteno, la luteína y la astaxantina se pueden combinar en cantidades variables relativas a la cantidad total de carotenoides de los tres. En otro ejemplo, el beta-caroteno puede comprender de 0% a 99,9% en peso del total de carotenoides. En un ejemplo, la luteína puede comprender de 0% a 99,9% en peso de los carotenoides totales. En un ejemplo, la astaxantina comprende de 0,1% a 25% en peso de los carotenoides totales. En un ejemplo, solo uno de beta-caroteno y luteína está presente en la composición junto con astaxantina. De acuerdo con la invención, los tres carotenoides están presentes en la composición. En un ejemplo, el beta-caroteno puede estar presente en 30% a 80%, o desde el 40% hasta el 60%, o en el 50%, o en el 55%, en peso total de carotenoides. En un ejemplo, la luteína puede estar presente desde el 10% hasta el 40%, o desde el 20% hasta el 40%, o desde el 25% hasta el 35%, o hasta el 25%, o el 30% por peso total de los carotenoides. En un ejemplo, la astaxantina puede estar presente en el 6% al 25%, o desde el 6% al 25%, o desde el 10% al 25%, o en el 15%, o en el 20%, o alrededor del 25%, en peso total de los carotenoides.
- En un ejemplo en la que solo uno de beta-caroteno y luteína puede estar presente junto con astaxantina, la relación de beta-caroteno o luteína a astaxantina puede ser de 25:75 a 90:10, o de 40:60 a 70:30, o de 75:25 a 90:10, o de 80:20 a 90:10, o 50:50.
- En un ejemplo en el que pueden estar presentes los tres carotenoides beta-caroteno, luteína y astaxantina, la relación de beta-caroteno a luteína puede ser de 1:10 a 10:1, o de 1:9 a 9:1, o de 1:8 a 8:1, o de 1:7 a 7:1, o de 1:6 a 6:1, o de 1:5 a 5:1, o de 1:4 a 4:1, o de 1:3 a 3:1, o de 1:2 a 2:1, o 2:1, o 1:1, al margen de la cantidad de astaxantina.
- La proporción de beta-caroteno a luteína y a astaxantina es de 1:1:0,6 a 10:1:3,5, o de 1:1:0,6 a 1:10:3,5 o de 1:1:0,002 a 10:1:0,01, o de 1:1:0,002 a 1:10:0,01, o de 4:1:1,5, o 2:1:1, o 2:1:0,5.
- Un método para aumentar la biodisponibilidad de los carotenoides descrito en el presente documento en un animal de compañía, comprende administrar al animal de compañía las composiciones descritas en el presente documento. Como se describe, una combinación de los carotenoides puede resultar en un aumento en la biodisponibilidad de los carotenoides cuando son administrados y consumidos por animales de compañía.
- En un ejemplo, la cantidad total de carotenoides administrados al animal de compañía por día puede ser de 2 mg a 100 mg, o de 2 mg a 50 mg, o de 2 mg a 20 mg. En una realización, la cantidad total de carotenoides administrados al animal de compañía por día es 20 mg. Por supuesto, como se conoce en la técnica, estas cantidades pueden variar

dependiendo del tipo y tamaño del animal de compañía al que se está administrando la composición. Por ejemplo, con los perros, se puede administrar a una raza gigante 20 mg de carotenoides totales por día, se pueden administrar a las razas grandes 12-13 mg de carotenoides totales por día, a las razas medianas se les pueden administrar 4-5 mg de carotenoides totales por día, y a las razas pequeñas se les puede administrar 2 mg de carotenoides totales por día. La raza pequeña puede referirse a un perro que tiene un peso corporal inferior a 9 kg (20 libras), la raza mediana puede referirse a un perro que tiene un peso corporal entre 9 y 23 kg (20 y 50 libras), la raza grande puede referirse a un perro que tiene un peso corporal entre 23 y 41 kg (50 y 90 libras), la raza gigante se refiere a un peso corporal superior a 41 kg (90 libras). Dentro de la cantidad total de carotenoides, los propios carotenoides individuales pueden administrarse en cantidades variables. En un ejemplo, el beta-caroteno se puede administrar a razón de 1 mg a 50 mg por día, o de aproximadamente 1 mg a 20 mg por día, o de 1 mg a 15 mg por día, o de 2 mg a 10 mg por día, o 1 mg por día, o 2 mg por día, o 5 mg por día. En un ejemplo, la luteína se puede administrar de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 50 mg por día, o de 1 mg a aproximadamente 20 mg por día, o de 1 mg a 15 g por día, o de aproximadamente 2 mg a 10 mg por día, o aproximadamente 1 mg por día o 2 mg por día, o 5 mg por día. En un ejemplo, la astaxantina se puede administrar de 0,001 mg a 25 mg por día, o de 0,01 mg a 25 mg por día, o de 0,1 mg a 20 mg por día, o de 0,1 mg a 10 mg por día, o de 0,5 mg a 5 mg por día, o de 0,5 mg a 2,5 mg por día, o de 1 mg a 2,5 mg por día, o de 1 mg a 2 mg por día, o 1 mg por día, o 2 mg por día, o 5 mg por día. Por supuesto, estos carotenoides individuales también pueden variar basándose en el tipo y la raza del animal de compañía.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

20 Suplementación de carotenoides - *in vivo*.

Dieciocho (18) rottweilers esterilizados/castrados (5-6 años de edad) fueron aleatorizados en tres grupos. Un grupo sirvió como grupo de control y recibió galletas de control sin beta-caroteno, luteína ni astaxantina, mientras que los otros dos grupos recibieron galletas que contenían cócteles antioxidantes, como sigue: un grupo recibió galletas que contenían beta-caroteno y luteína (BL), y el otro grupo recibió galletas que contenían beta-caroteno, luteína y astaxantina (BLA). Todos los perros estaban en una dieta de lams® Large Breed Diet (Vitamina E nivel GA = 140 UI). Las galletas se utilizaron para administrar dosis diarias de carotenoides. Cada perro recibió cuatro galletas por día para ingerir los niveles deseados de carotenoides. Las galletas tenían un tamaño de aproximadamente 10-12 gramos.

Las galletas de control fueron Eukanuba® Healthy Extra Adult Maintenance Biscuits.

30 Las galletas que contenían beta-caroteno y luteína eran galletas Eukanuba ® Healthy Extra Adult Maintenance. Las galletas se administraron a los perros de modo que los perros consumieron 21,36 mg por día de beta-caroteno y luteína combinados, y en una proporción de 63:37 beta-carotenos a luteína.

Las galletas que contienen beta-caroteno, luteína y astaxantina eran Eukanuba ® Healthy Extra Adult Maintenance. Las galletas se administraron a los perros de manera que dichos perros consumieron 21,55 mg por día de beta-caroteno, luteína y astaxantina y en una proporción de 61:16:23 de beta-caroteno a luteína y a astaxantina.

35 La Tabla 1 muestra un resumen de carotenoides para los Rottweilers que consumen las galletas BL (golosina 1) y las galletas BLA (golosina 2). La galleta de control se utilizó para medir y comparar las medidas fisiológicas de los perros. Como muestra la tabla, los perros consumieron aproximadamente la misma cantidad de carotenoides por día (21,36 frente a 21,55), pero la golosina 1 solo proporcionó beta-caroteno y luteína, mientras que la golosina 2 proporcionó beta-caroteno, luteína y astaxantina. Por consiguiente, la relación de los carotenoides individuales también fue diferente, como se muestra en la Tabla 1. Debe observarse que la astaxantina en este ejemplo era una mezcla de astaxantina y ésteres de astaxantina.

Tabla 1: Absorción de carotenoides

	Carotenoides administrados en total mg/día/perro	Relación de carotenoides	Conc. Suero en nM/L por mg de carotenoide admin.		% de incremento de la absorción	
			B	L	B	L
Golosina 1	21,36	B:L:: 63:37	0,73	2,25	0	0
Golosina 2	21,55	B:L:A :: 61:16:23	1,48	5,46	102,02	142,27

45 Como se muestra en la Tabla 1, los carotenoides pudieron ser absorbidos por los Rottweilers que consumen las galletas de la golosina 1 y la golosina 2 y alcanzaron la circulación sistémica. Los carotenoides en suero se midieron mediante HPLC en Rottweilers después de seis semanas de suplemento de carotenoides en forma de galletas. La concentración del suero se muestra en la Tabla 1.

Los perros que consumieron la golosina 1 recibieron un total de carotenoides de 21,36 mg/día con aproximadamente 13,5 mg/día de beta-caroteno (B) y aproximadamente 7,8 mg/día de luteína (L). Estas cantidades dieron como resultado una relación de beta-caroteno a luteína de aproximadamente 63:37 cuando se alimentaron. Los perros que consumieron la golosina 2 recibieron un total de carotenoides de 21,55 mg/día con aproximadamente 13,2 mg/día de beta-caroteno (B), aproximadamente 3,4 mg/día de luteína (L) y aproximadamente 4,9 mg/día de astaxantina (A). Estas cantidades dieron como resultado una relación de beta-caroteno a luteína y a astaxantina de aproximadamente 61:16:23, comprendiendo la astaxantina aproximadamente el 23% de los carotenoides totales como se alimenta.

Por consiguiente, manteniendo la cantidad total de carotenoides aproximadamente igual para la golosina 1 y la golosina 2, y con la adición de astaxantina en la golosina 2, la absorción de beta-caroteno aumentó aproximadamente un 102% (1,48 frente a 0,73), y la absorción de luteína aumentó en aproximadamente el 142% (2,25 frente a 5,46) en comparación con la golosina 1, que no contiene astaxantina, medido por la concentración sérica.

Adicionalmente, el cambio de sensibilidad de los linfocitos de sangre periférica (PBL) al desafío de H₂O₂ *ex vivo*, como marcador de susceptibilidad al daño del ADN, se realizó para los perros en este ejemplo. Los PBL probados de los perros que consumieron las galletas que contenían beta-caroteno, luteína y astaxantina experimentaron una reducción del daño en el ADN de un 5,2% en comparación con el valor inicial, que es antes de que los perros comenzaran a consumir las galletas. Sin embargo, los PBL probados de los perros en galletas que contienen beta-caroteno y luteína experimentaron una reducción del daño en el ADN de solamente un 2,4%. Estos son en comparación con un 10,1% de aumento del daño del ADN a los PBL probados de perros que consumen las galletas de control, que no contenían beta-caroteno, luteína ni astaxantina. Así, como evidencia en este ejemplo, aunque las galletas que contienen tanto el beta-caroteno y la luteína como el beta-caroteno, la luteína y la astaxantina ayudaron a proteger las PBLs del daño en el ADN, la galleta que contiene el beta-caroteno, la luteína y la astaxantina proporcionó una mayor protección. Este ejemplo es reflejo de la reducción de la susceptibilidad al daño del ADN en los perros que consumen las galletas que contienen carotenoides y, por tanto una reducción del estrés oxidativo.

In vitro, la absorción celular de carotenoides que se acopla a la digestión *in vitro* con el modelo celular Caco-2 se usó para examinar la adquisición celular de carotenoides micelarizados de alimentos digeridos y, por lo tanto, predecir la absorción de carotenoides de alimento/dieta. Estos se muestran en los ejemplos 2, 3 y 4.

Ejemplo 2

Carotenoides - absorción *in vitro*.

Se desarrolló una digestión *in vitro* junto con un modelo de cultivo intestinal para imitar la absorción de carotenoides *in vivo*. Es importante tener en cuenta que la absorción determinada por la digestión *in vitro* está muy correlacionada con los datos obtenidos muestreando el contenido luminal del intestino delgado de sujetos humanos alimentados con vegetales ricos en carotenoides y datos de biodisponibilidad a partir de estudios humanos publicados.

Las interacciones entre el beta-caroteno (B), la luteína (L) y la astaxantina (A) o el éster de astaxantina (AE) se examinaron utilizando el modelo de digestión simulada/células Caco-2 acoplado. Los carotenoides celulares después de cuatro horas de incubación con micelas generadas durante la digestión simulada de aceite rico en carotenoides se presentan en la Tabla 2 a continuación.

En BLA (A es el 25% del total de carotenoides), la absorción celular B es del 8,59% y aumenta en un 50,6% en comparación con la absorción de B en B solo; la absorción de L es del 6,37% y aumentó un 5,88% en comparación con la absorción de L en L solo. En BLAE (AE es 25% del total de carotenoides), la absorción celular B es 12,09% y se incrementa en 112,05% en comparación con la absorción celular B en B sola; la absorción celular de L es del 12,18% y aumentó en un 102,35% en comparación con la absorción celular de L solo en L.

% de absorción celular de carotenoides = (carotenoide en células/carotenoide añadido en el alimento de prueba) * 100%.

Tabla 2: Absorción celular de carotenoides *in vitro*.

	Amt añadido nmol/50mL	Relación de carotenoides	% de absorción celular de carotenoides		% de incremento de la absorción celular de carotenoides	
			B	L	B	L
beta-caroteno	205,1	100	5,70	NA	0,00	NA
luteína	193,5	100	NA	6,02	NA	0,00
B:L:A	201,2	51:24:25	8,59	6,37	50,60	5,88
B:L:AE	201,2	51:24:25	12,09	12,18	112,05	102,35
B:A	203,2	51:50	5,49	NA	- 3,77	NA
L:A	197,4	48:50	NA	5,76	NA	- 4,33
L:AE	197,4	48:50	NA	9,05	NA	50,35

Digestión simulada: Se homogeneizó yogur desnatado (2,7 g) en 10 mL de solución salina 120 mM. La mezcla se transfirió a un tubo de ensayo de vidrio de 50 mL. Se añadió cuidadosamente aceite rico en carotenoides para cada reacción (6 replicados por aceite de prueba), y el volumen total de aceite se ajustó a 300 μ L usando aceite de soja. El procedimiento para la digestión simulada siguió el protocolo estándar (véase Failla ML., Chitchumroonchokchai C. (2005). Modelos *in vitro* como herramientas para el cribado de las biodisponibilidades relativas de los carotenoides provitamina A en los alimentos. HarvestPlus Technical Monograph Series 3. 32 p. www.harvestplus.org/pdfs/tech03.pdf), excepto que las reacciones contenían enzimas pancreáticas y extracto de bilis. También se realizó la digestión simulada sin extracto biliar para demostrar que la transferencia de carotenoides del aceite a la fracción acuosa dependía de la bilis. Después de completar la digestión gástrica y del intestino delgado, se centrifugó una parte alícuota (9 mL) de digesta a 12.000 x g, 4 °C durante 45 min para aislar la fracción acuosa que contiene carotenoides micelares de materiales no digeridos residuales. La fracción acuosa se pasó a través de un filtro de jeringa (0,22 μ L) para determinar los carotenoides que se repartieron en la fase acuosa o en la fase micelar. Partes alícuotas de digesta y fracción acuosa se almacenaron a -20 °C durante un máximo de una semana antes de la extracción. El beta-caroteno y la luteína se cuantificaron de acuerdo con Chitchumroonchokchai et al. (véase Chitchumroonchokchai C, Schwartz SJ., Failla ML. Evaluación de la biodisponibilidad de luteína de las comidas y suplemento utilizando la digestión simulada y células intestinales humanas Caco-2. *J Nutr*. 2004; 134: 2280 - 2286), y se midió la astaxantina como se describe en Lin WC et al. (Lin WC, Chien JT, Chen BH. Determinación de carotenoides en cáscaras de langostinos (*Parapenaeopsis hardwickii*) mediante cromatografía líquida. *J Agric Food Chem*. 2005 Jun 29; 53 (13): 5144 - 9).

Absorción celular de carotenoides a partir de micelas generadas durante la digestión de aceite enriquecido con carotenoides individuales o mezclas de carotenoides: las células Caco-2 (HTB37; pases 25-28) obtenidas de ATCC (American Tissue Cell Culture) en el paso 19 se mantuvieron en 6 pocillos de platos de plástico. Las células se cultivaron en DMEM completo más 15% de FBS inactivado por calor durante la fase de replicación. Después de la confluencia, el FBS se redujo a 7,5% y se cambiaron los medios cada segundo día y el día antes de la experimentación. Los cultivos se utilizaron para experimentos a 11 - 14 dpc (días después de la confluencia). La fracción acuosa de la digestión simulada de muestras de prueba se diluyó 1:4 con DMEM basal para hacer medios de prueba para tratar las células. A cada pocillo de una placa de plástico de 6 pocillos se añadieron 2 mL de medio de prueba y las placas se devolvieron a la incubadora de cultivo celular (5% de CO₂, 37 °C) durante cuatro horas. Después de la exposición al medio de prueba durante cuatro horas, las células se recolectaron lavando 1x con PBS frío más 2 g/L de albúmina y 2x con PBS frío. Las células se rasparon en 1,5 mL de PBS frío y se transfirieron a un tubo de ensayo de polipropileno de 15 mL. El sedimento celular se recogió por centrifugación a 800 x g, 4 °C durante 10 min. El PBS se desechó, luego el sedimento celular se puso en blanco con nitrógeno y se almacenó a -20 °C para el análisis de carotenoides por HPLC dentro de una semana.

Ejemplo 3

Carotenoides - absorción *in vitro*.

Las interacciones entre el beta-caroteno (B), la luteína (L) y la astaxantina (A) se examinaron usando un modelo celular Caco-2. Los resultados se presentan en la Tabla 3.

En BLA_{high} (A es 25% del total de carotenoides), la absorción de B es 18,5% y se incrementa en 20,92% en comparación con la absorción de B en B solo; la absorción de L es del 34,1% y el aumento del 5,88% en comparación con la absorción de L en L solo. En BLA_{low} (A es 12,5% del total de carotenoides), la absorción de B y L muestran un grado similar de aumentos en comparación con BLA_{high}.

% de absorción de carotenoides = (carotenoides en la célula + carotenoides en el compartimento lateral basal) * 100% / carotenoides en el medio de prueba

Tabla 3: Absorción celular de carotenoides *in vitro*.

Tratamiento	Carotenoides en micelas sintéticas nmol/50mL	Relación de carotenoides	% de absorción celular de carotenoides		% de incremento de la absorción celular de carotenoides comparado con carotenoide único	
			B	L	B	L
B	50	100	15,30	NA	0,00	NA
L	25	100	NA	31,8	NA	0,00
B:L:A _{high}	100	50:25:25	18,50	34,10	20,92	7,23
B:L:A _{low}	87,5	57:29:14	18,50	34,10	20,92	7,23

5 Se cultivaron células intestinales humanas Caco-2 y se mantuvieron sobre insertos Transwell (poros de 3,0 µm) según el protocolo en Failla ML., Chitchumroonchokchai C. (2005) Modelos *in vitro* como herramientas para el cribado de la biodisponibilidad relativa de carotenoides provitamina A en los alimentos. HarvestPlus Technical Monograph Series 3. 32 p. www.harvestplus.org/pdfs/tech03.pdf. Los cultivos se utilizaron 21 días después de la confluencia (dpc).

Las micelas sintéticas de reserva (SM) que contenían β-caroteno (B), o luteína (L) o astaxantina (A), se prepararon como se describe en Chitchumroonchokchai et al. (2004).

10 Las células tratadas se incubaron en entorno humidificado de 95% de aire, 5% CO₂ a 37 °C durante 18 horas antes de recoger el medio gastado de la cámara apical (AP) y medio basolateral (BL). Todas las muestras se congelaron a -80 °C bajo nitrógeno hasta su análisis. El análisis de carotenoides en los medios y las células se cuantificó según lo descrito por Chitchumroonchokchai (véase Chitchumroonchokchai C, Schwartz SJ., Failla ML. Evaluación de la biodisponibilidad de luteína de comidas y suplemento utilizando digestión simulada y células intestinales humanas Caco-2. J Nutr. 2004; 134: 2280 - 2286). El contenido de proteínas de las células se determinó por el ensayo de ácido bicinónico. (Pierce - www.piercenet.com/files/1296as8.pdf). La integridad de las monocapas se determinó mediante la monitorización de la tasa de transporte paracelular del rojo de fenol (véase Chitchumroonchokchai C, Schwartz SJ., Failla ML. Evaluación de la biodisponibilidad de luteína en comidas y suplemento utilizando digestión simulada y células intestinales humanas Caco-2. J Nutr. 2004; 134: 2280 - 2286).

Ejemplo 4

20 Carotenoides - absorción *in vitro*.

25 Las interacciones entre beta-caroteno (B), luteína (L) y astaxantina (A) se examinaron utilizando la digestión simulada y el modelo de células Caco-2 como se describe en el Ejemplo 2. La concentración final de carotenoides en el medio de prueba fue 200 nmol de β-caroteno o bien 200 nmol de luteína, así como mezclas que contengan 100 nmol de β-caroteno, 50 nmol de luteína y 50 u 8 nmol de astaxantina libre (no esterificada). Las monocapas de células Caco-2 (12 dpc) se expusieron a los compuestos de prueba y se incubaron durante 4 horas. Las células se recogieron y se extrajeron para el análisis de la absorción celular mediante HPLC. El porcentaje de absorción celular se calculó como pmol de carotenoides en las células dividido por pmol de carotenoides en 2 mL de medio de prueba.

30 Los resultados se presentan en la Tabla 4. En BLA_{high} (A es el 25% del total de carotenoides), la absorción de B es del 20,9%. La absorción de L es del 41,2%. En BLA_{low} (A es el 5% de los carotenoides totales), la absorción de B es del 25,4%, la absorción de L es del 46,9%.

Tabla 4: Absorción de carotenoides *in vitro*.

Tratamiento	Amt añadido nmol/50mL	Relación de carotenoides	% de absorción celular de carotenoides	
			B	L
B:L:A _{high}	200	100:50:50	20,90	41,20
B:L:A _{low}	158	100:50:08	25,40	46,90

35 Por tanto, como se muestra en las Tablas 1 a 4, se produce un aumento en la absorción de los carotenoides cuando la astaxantina (o éster de astaxantina) se combina con beta-caroteno y/o luteína, incluso en cantidades relativamente bajas de cetocarotenoide. Este aumento de la absorción se muestra tanto *in vitro* como *in vivo*.

Beneficios

Las composiciones que contienen carotenoides como se describen en el presente documento pueden proporcionar beneficios saludables para los animales de compañía. Los beneficios pueden incluir capacidad de aprendizaje, función cerebral óptima, desarrollo cerebral, memoria, desarrollo neurológico, agilidad, estado de alerta, capacidad cognitiva,

5 disfunción cognitiva, enfermedad neurodegenerativa, neurotransmisión alterada, reducción de lesión cerebral inducida por isquemia, prevención o disminución del deterioro relacionado con la edad de la decadencia mental/cognitiva/de la memoria, resistencia física y recuperación muscular, resistencia y reducción del tiempo de recuperación, tiempo de correr/caminar/cazar, el número de escaleras subidas, la quema de grasa para proporcionar energía a las células musculares, el beneficio sensorial de una visión clara, ojos menos nublados, menos degeneración de retina relacionada con la edad, reducción de la fatiga ocular, mejora auditiva y olfativa, mejora de la piel en la protección UV, protección de la red antioxidante natural y el ADN de la piel, antiinflamación de la piel, la piel y el pelo (reducen el picor y la infección de oído), estrés oxidativo (incluyendo la reducción del daño del ácido nucleico), respuesta inmunitaria/defensa del cuerpo/resistencia a la enfermedad, respuesta a la vacuna, movilidad, salud articular/ósea, nivel de actividad, calidad de vida, índice de fragilidad, reducción de inflamación, beneficios gastrointestinales (GI), modificación de la flora intestinal, reducción de las molestias GI, diarrea, mejora del estrés oxidativo (como se describe aquí en el Ejemplo 1), estado de AOX por las combinaciones de AOX, mantenimiento del estado de AOX en personas mayores o enfermedades diarreicas, salud renal, enfermedad renal, mantenimiento de un peso saludable, salud dental y de las encías, prevención del cáncer, salud cardioprotectora y prevención de enfermedades cardiovasculares.

15 Adicionalmente, las realizaciones de la invención se refieren también a un método para mejorar la salud de un animal de compañía mediante la administración de las composiciones descritas en el presente documento. Como se sabe, estos carotenoides tienen beneficios para la salud de los animales de compañía, y el aumento de la biodisponibilidad de esos carotenoides a su vez conducirá al aumento de los beneficios para la salud.

20 Así pues, como se demuestra en el presente texto, las combinaciones de carotenoides descritas en este documento pueden hacer aumentar la biodisponibilidad de los carotenoides, lo que puede aumentar la salud del animal de compañía. En un ejemplo específico, se produce una protección mejorada contra el estrés oxidativo de los linfocitos de la sangre periférica del perro.

Métodos

Análisis de HPLC.

25 El análisis de HPLC se realizó como se describe en Lin WC, Chien JT, Chen BH. Determinación de carotenoides en cáscaras de langostino (*Parapenaopsis hardwickii*) mediante cromatografía de líquidos. *J Agric Food Chem.* 2005 29 de junio; 53 (13): 5144 - 9. Se inyectaron muestras de cincuenta microlitros en el sistema de HPLC. Todos los procedimientos se realizaron bajo una luz tenue y en hielo.

Carotenoides del suero.

30 El nivel de carotenoides en suero se midió de la siguiente manera. Se extrajeron de cada sujeto aproximadamente 5 mL de sangre venosa no en ayunas a tubos separadores de suero (BD, San Jose, CA). Las muestras de sangre se centrifugaron a 5.000 rpm durante 5 min a 4 °C, y después se extrajo el suero y se almacenó inmediatamente a -70 °C hasta su análisis. Los carotenoides (solubles en lípidos) se extrajeron de 100 µL de suero basándose en los métodos descritos anteriormente por Khachik F y otros (Khachik F, Spangler CJ, Smith JC Jr, Canfield LM, Steck A, Pfander H. Identificación, cuantificación y concentraciones relativas de carotenoides y sus metabolitos en la leche y el suero humanos, *Anal Chem.* 15 de mayo de 1997; 69 (10): 1873 - 81). Brevemente, se añadieron 100 µL de suero se a 200 µL de butilhidroxitolueno (BHT) al 0,1% en etanol para precipitar las proteínas, y luego se agregaron 500 µL de acetato de etilo para extraer los carotenoides. La muestra se centrifugó a 2.000 x g durante 5 min a 4 °C y se recogió la fase sobrenadante. Luego se extrajo la muestra con 500 µL de acetato de etilo dos veces más y se extrajo con 500 µL de hexano una vez. Los sobrenadantes recogidos se combinaron y se secaron bajo vacío. La muestra seca se disolvió en 1 mL de metanol al 50% y luego se extrajo tres veces con 500 µL de hexano. Los sobrenadantes recogidos se secaron después y se redisolviaron en 100 µL de solvente corriente antes del análisis por HPLC.

Cuantificación del caroteno en una composición alimenticia.

Caroteno: la determinación del caroteno en una composición alimenticia por HPLC.

45 Equipo:

HPLC con detección UV.	Serie Agilent 1100 con detector de PDA o equivalente
Sistema de datos	Dionex Chromeleon Chromatography Data System o equivalente
Columna de HPLC	ProntoSil C30; Partícula 3 m; 150 mm x 4,6 mm; MacMod Científico (Chads Ford, PA) nº 2546H300PS030
50 Balanza analítica	precisión a 0,0001 g
Molino de muestras	molino eléctrico Straub Modelo 4E, placas 4B, accionamiento de tornillo

ES 2 712 562 T3

	Baño de agua con agitación	Capaz de mantener una temperatura de 70 °C ± 0,1 C°; 50 golpes/min
	Centrífuga	Con cesta adecuada para tubos de centrifuga de 50 mL; capaz para 1750 rpm
	Consumibles:	
5	Tubos de centrifuga	50 mL de capacidad con tapones; VWR n° 21020-695 o equivalente
	Filtro de muestra	filtro de centrifuga Corning 0,45 µm Spin-X; VWR n° 29442-762 o equivalente
	Vial de cargador de muestras	2 mL; viales ámbar con tapones de septo adecuados para su uso con cargador de muestras
10	Reactivos:	
	Hexano	calidad HPLC; JT Baker n° 9304 o equivalente
	Acetato de etilo	calidad HPLC; JT Baker n° 9282 o equivalente
	Acetona	calidad HPLC; JT Baker n° 9002 o equivalente
	Tolueno	calidad HPLC; JT Baker n° 9351 o equivalente
15	Etanol	Apper Chemical, no desnaturalizado
	Metanol	calidad HPLC; JT Baker n° 9093 o equivalente
	Metil-t-butil éter	calidad HPLC; JT Baker n° 9042 o equivalente
	Hidróxido de potasio	calidad reactivo; JT Baker n° 3140-01
	t-Butilhidroxitolueno	> 99,0; Sigma n° C-4582
20	Etoxiquina	90%, VWR n° IC15796380
	trans-beta-Caroteno	Chromadex n° CDXA-10-0385 (Irvine, CA) no sustituto
	Agua purificada	agua purificada Milli-Q o equivalente
	Soluciones:	
25	Disolvente de extracción 1	hexano (300 mL) + acetona (210 mL) + tolueno (210 mL) + acetato de etilo (180 mL) + BHT (10 g)
	Disolvente de extracción 2	75% de hexano/25% de acetato de etilo (v/v)
	KOH metanólico	40% de KOH en metanol (p/v)
	Sulfato sódico al 10%	10% de sulfato sódico en agua purificada (p/v)
	Fase móvil	75% de metanol/25% de metil-t-butil éter (v/v)
30	Procedimiento:	
	1. Moler aproximadamente de 250 g a 300 g de muestra utilizando un molino Straub.	
	2. Pesar exactamente 1,0 g de polvo de muestra en un tubo de centrifuga de vidrio de 50 mL. Anotar la masa a ± 0,0001 g.	
	3. Agregar 7,5 mL del Disolvente de extracción 1 a la muestra y agitar en vórtice durante 1 min.	
35	4. Añadir 4 mL de muestra en solución de KOH metanólico al 40% y agitar en vórtice durante 1 min.	
	5. Tapar y colocar la muestra en un baño de agua con agitación durante 60 min.	

ES 2 712 562 T3

6. Retirar la muestra y dejar enfriar a temperatura ambiente.
7. Añadir 7,5 mL de disolvente de extracción 2 y agitar en vórtice durante 1 min.
8. Añadir 10 mL de solución de sulfato sódico al 10% y agitar en vórtice durante 1 min.
9. Centrifugar durante 8 min a 1750 rpm.
- 5 10. Retirar aproximadamente 2 mL de capa orgánica y filtrar a través de un filtro de nilón de 0,45 µm.
11. Pipetear exactamente 1,00 mL de filtrado en un vial de cargador de muestras ámbar y secar bajo nitrógeno.
12. Pipetear exactamente 1,00 mL de fase móvil de cargador de muestras ámbar y agitar en vórtice durante 1 min.

10 Condiciones de HPLC:

Caudal	1,7 mL/min isocrático
Tiempo de ejecución	20 min
Volumen de inyección	100 µL
Temperatura de la columna	25 °C

15 Detección 452 nm

Tiempos de retención aproximados:

4,3 min	15-cis-beta-caroteno
4,7 min	13-cis-beta-caroteno
5,3 min	trans-α-caroteno
6,25 min	trans-beta-caroteno
7,20 min	9-cis-beta-caroteno

20

Calibración:

1. La calibración con un estándar de trans-beta-caroteno se realiza como mínimo una vez al año o cada vez que se cambia el sistema.

- 25 a. Todos los estándares están preparados en la fase móvil.
- b. Las masas medidas se corrigen para la pureza ajustada del certificado de análisis.
- c. La calibración se basa en una curva estándar de tres puntos que varía de 0,1 a 1,0 µg/mL utilizando mínimos cuadrados, ajuste de regresión lineal forzado a cero.
- d. La misma curva de respuesta se aplica a todos los isómeros de caroteno.

30 2. Durante la calibración, se prepara 1 µg/mL de estándar de control de calidad, QC, de trans-beta-caroteno/mL que contiene 100 ppm de etoxiquina y se almacena a -20 °C. El estándar de QC se inyecta con cada conjunto de muestras para verificar la idoneidad del sistema.

Luteína: la determinación de la luteína en una composición alimenticia mediante HPLC.

Equipo:

35 HPLC con detección UV	Serie Agilent 1100 con detector de PDA o equivalente
Sistema de datos	Dionex Chromeleon Chromatography Data System o equivalente

ES 2 712 562 T3

	Columna HPLC	columna Phenomenex Luna Silica (2); 5 m partícula; 150 mm x 4,6 mm; Phenomenex (Torrance, CA) nº 00F-4043-E0
	Balanza analítica	exactamente a 0,0001 g
	Molino de muestras	molino eléctrico Straub Modelo 4E, placas 4B, accionamiento de tornillo
5	Baño de agua con agitación	capaz de mantener una temperatura de 70 °C ± 0,1 C°; 50 golpes/min
	Centrífuga	con cesta adecuada para tubos de centrifuga de 50 mL; capaz de 1750 rpm
Consumibles:		
	Tubos de centrifuga	50 mL de capacidad con tapones; VWR 21020-695 o equivalente
10	Filtro de muestras	filtro de centrifuga Spin-X Corning de 0,45 µm; VWR 29442-762 o equivalente
	Vial de cargador de muestras	2 mL; viales ámbar con tapones de septo adecuados para su uso con cargador de muestra
Reactivos:		
15	Hexano	calidad HPLC; JT Baker nº 9304 o equivalente
	acetato de etilo	calidad HPLC; JT Baker nº 9282 o equivalente
	acetona	calidad HPLC; JT Baker nº 9002 o equivalente
	tolueno	calidad HPLC; JT Baker nº 9351 o equivalente
	etanol	Apper Chemical, sin desnaturalizar
20	metanol	calidad HPLC; JT Baker nº 9093 o equivalente
	hidróxido de potasio	calidad reactivo; JT Baker nº 3140-01
	butilhidroxitolueno	> 99,0%; Sigma nº C-4582
	etoxiquina	90%, VWR nº 15796380
	luteína	ChromaDex nº CDXA-08-0549 (Irvine, CA) no sustituto
25	agua purificada	agua purificada Milli -Q o equivalente
Soluciones:		
	Disolvente de extracción 1	hexano (300 mL), acetona (210 mL), tolueno (210 mL), acetato de etilo (180 mL), BHT (10 g)
	Disolvente de extracción 2	75% hexano/25% acetato de etilo (v/v)
30	KOH metanólico	KOH al 40% en metanol (p/v)
	Sulfato sódico al 10%	10% de sulfato sódico en agua purificada (p/v)
	Fase móvil	65% hexano/30% acetato de etilo, 5% acetona (v/v/v)
Procedimiento:		
	1. Moler de 250 a 300 g de muestra utilizando un molino Straub Model 4E.	
35	2. Pesar exactamente 1,0 g de polvo de muestra en un tubo de centrifuga de vidrio de 50 mL. Registrar la masa a ± 0,0001 g.	

ES 2 712 562 T3

3. Añadir 7,5 mL de disolvente de extracción 1 a la muestra y agitar en vórtice durante 1 min.
4. Añadir 4 mL de muestra de solución metanólica de KOH al 40% y agitar en vórtice durante 1 min.
5. Tapar y poner la muestra en un baño de agua con agitación durante 60 min.
6. Retirar la muestra y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- 5 7. Añadir 7,5 mL de Disolvente de extracción 2 y agitar en vórtice durante 1 min.
8. Añadir 10 mL de solución de sulfato sódico al 10% y agitar en vórtice durante 1 min.
9. Centrifugar durante 8 min a 1750 rpm.
10. Retirar aproximadamente 2 mL de capa orgánica y filtrar a través de un filtro de nilón de 0,45 m.

Condiciones de HPLC:

10	Caudal	1,5 mL /min isocrático
	Tiempo de ejecución	15 min
	Volumen de inyección	100 µL
	Temperatura de la columna	25 °C
	Detección	452 nm

15 Tiempos de retención aproximados:

- 5,5 min trans luteína
- 7,0 min 9-cis luteína
- 7,3 min 13-cis luteína
- 8,0 min 15-cis luteína

20 Calibración

1. Las calibraciones con el estándar de trans luteína se realizan como mínimo una vez al año o cada vez que se cambia el sistema.

- a. Todos los estándares están preparados en la fase móvil.
- b. Las masas medidas se corrigen para la pureza ajustada del certificado de análisis.

25 c. La calibración se basa en una curva estándar de tres puntos que varía de 0,1 a 1,0 µg/mL utilizando mínimos cuadrados, ajuste de regresión lineal forzado hasta cero.

- d. La misma curva de respuesta se aplica a todos los isómeros de luteína.

30 2. Durante la calibración, se prepara 1 µg/mL de estándar de control de calidad de trans-luteína que contiene 100 ppm de etoxiquina y se almacena a -20 °C. El estándar de QC se inyecta con cada conjunto de muestras para verificar la idoneidad del sistema.

Astaxantina: la determinación de astaxantina en una composición de alimentos por HPLC.

35 Este método se basa en el método titulado "Método espectrofotométrico y de análisis de HPLC para determinar el contenido de astaxantina en AstaREAL® L10" publicado en www.astareal.com por Fuji Chemical Industry Co., Ltd. Primero, la astaxantina esterificada debe hidrolizarse (desesterificarse) por completo por procedimiento enzimático para producir toda la astaxantina libre.

ES 2 712 562 T3

Reactivos y equipos:

- tampón Tris-HCl 0,05 M (pH 7,0)
- Colesterol esterasa: Wako Pure Chem., n° cat. 037-11221 o Sigma, n° cat. C9281
- Trans-beta-apo-8'-carotenal, Fluka n° cat. 10829 [estándar interno para análisis por HPLC]
- 5 Astaxantina: Wako Pure Chem., n° cat. 019-18663 o Sigma, n° cat. A9335 [estándar analítico]
- Solución de ácido fosfórico al 1% (v/v)
- Acetona, calidad espectrofotométrica
- Hexano, calidad HPLC
- Éter de petróleo
- 10 Metanol, calidad analítica
- MTBE: t-butil-metil-éter, calidad espectrofotométrica
- Sulfato sódico decahidrato
- Sulfato sódico anhidro
- Tubos de centrifuga de 10 mL
- 15 Matracas volumétricos de 20 mL
- Matracas volumétricos de 50 mL
- Matracas volumétricos de 100 mL
- Matracas volumétricos de 200 mL
- Pipetas volumétricas de 1,0 mL
- 20 Pipetas volumétricas de 2,0 mL
- Pipetas volumétricas de 5,0 mL
- Pipetas volumétricas de 10,0 mL
- Filtro de jeringa de 0,45 μ m
- Baño de agua
- 25 Balanza analítica
- Centrifuga
- Sonicador
- Espectrofotómetro
- HPLC equipado con un detector UV/VIS
- 30 Columna de HPLC: YMC- Carotenoid™ S5 micron, 250 mm de longitud x 4,6 mm de diámetro.

Procedimiento:

Solución de colesterol esterasa para la hidrólisis de los ésteres de astaxantina:

Disolver una cantidad de colesterol esterasa pesada exactamente (Wako Pure Chem., Cat. n°: 037-11221 o Sigma, cat n°: C9281) en Tris-HCl 50 mM (pH 7,0) que tiene una concentración conocida de 4 unidades por mL.

Preparación del estándar interno:

Pesar con precisión aproximadamente 7,5 mg de trans-beta-apo-8'-Carotenal (Fluka, nº de catálogo: 10829, >20 (UV-VIS) apocarotenal) y transferir a un matraz volumétrico de 200 mL.

Disolver en acetona, diluir con acetona a volumen, y mezclar.

5 Preparación del estándar:

Transferir aproximadamente 5 mg de reactivos de astaxantina (Wako Pure Chem., nº de cat. 019-18663 o Sigma, nº de cat.: A9335) a un matraz aforado de 200 mL, disolver en aproximadamente 100 mL de acetona, tratar con ultrasonidos durante un minuto en agua tibia y dejar equilibrar a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Diluir con acetona a volumen y mezclar (solución madre estándar).

10 Pipetear 2,0 mL de solución madre estándar en un matraz aforado de 20 mL, diluir con acetona hasta volumen, y mezclar (solución estándar A).

Pipetear 2,0 mL de solución madre estándar y 10,0 mL de solución de estándar interno en un matraz aforado de 20 mL, diluir con acetona a volumen y mezclar (solución estándar B).

Preparación del ensayo:

15 Calentar AstaREAL® L10 en un baño de agua precalentado a 50-60 °C durante 30 minutos. Agitar vigorosamente a intervalos de 10 minutos.

Transferir aproximadamente 30 mg de AstaREAL® L10 a un tubo de vidrio de 10 mL, añadir aproximadamente* 5 mL de acetona para disolver el AstaREAL® L10.* Anotar el peso exacto.

20 Pipetear la solución de AstaREAL® L10 desde el tubo de vidrio en un matraz volumétrico de 100 mL. Enjuagar el tubo con más acetona para recuperar todo el color naranja restante. Para cada enjuague adicional, agregar 5 mL de acetona en el tubo, remover suavemente y pipetear el contenido en el matraz. Ajustar el volumen final a 100 mL con acetona, este stock es el stock de muestra.

Pipetear 2,0 mL del stock de muestra en un matraz aforado de 20 mL, diluir con acetona a volumen y mezclar (solución de ensayo A).

25 Transferir 2,0 mL de la solución de ensayo A a un tubo de centrifuga de vidrio de 10 mL, agregar 1,0 mL de solución LS y mezclar.

Poner el calentador de bloque a 37 °C, añadir 3,0 mL de solución de colesterol esterasa al tubo de ensayo y mezclar por inversión suave.

30 Dejar reaccionar a 37 °C durante 45 minutos. Invertir suavemente/lentamente cada 10 minutos, al menos dos veces, durante la reacción.

Añadir 1 g de sulfato sódico decahidrato y 2 mL de éter de petróleo, agitar en vórtice durante 30 segundos y centrifugar a 3.000 rpm durante 3 minutos.

Transferir la capa de éter de petróleo a un tubo de centrifuga de vidrio de 10 mL que contiene 1 g de sulfato sódico anhidro.

35 Evaporar la capa de éter de petróleo a vacío o en una corriente de gas inerte a temperatura ambiente, añadir 3 mL de acetona, someter a ultrasonidos y filtrar (Solución de Ensayo B).

Método de análisis de HPLC de fase inversa en relación con el contenido de astaxantina:

Determinar la absorbancia de la solución estándar A a 474 nm, usando acetona como blanco.

40 Correr la fase móvil a través de las condiciones de HPLC como se especifica en la Tabla 1 de HPLC antes del análisis de la muestra.

Analizar una parte alícuota de la Solución estándar B y la Solución de ensayo B por HPLC en las siguientes condiciones:

Tabla de HPLC:

ES 2 712 562 T3

Detector: detector UV/VIS, a 474 nm

Columna: YMC- Carotenoid™ S5μ, 4,6 x 250 mm

Temperatura de la columna: 25 °C

Caudal: 1,0 mL/minuto

5 Vol. de Inyección: 20 μL

Fase móvil: metanol, t-butilmetiléter, solución acuosa de ácido fosfórico al 1%

La fórmula de la fase móvil (%) es la siguiente:

Tiempo(min.)	Metanol	t-butilmetiléter	sol. acuosa de ácido fosfórico al 1%
0	81	15	4
15	66	30	4
23	16	80	4
27	16	80	4
27,1	81	15	4
35	81	15	4

Tiempo de retención para la identificación:

10 Componentes	Tiempo de retención (min)
13-cis-astaxantina	9
trans-astaxantina	10
9-cis-astaxantina	14
trans-beta-apo-8'-carotenal	17

15 (Estándar interno)

Calcular la concentración, en mg por mL, de astaxantina en la solución estándar A tomada por la fórmula: $ASa/210$

en la cual ASa es la absorbancia de la solución estándar A, y 210 es la absorbancia de una solución de astaxantina 1 (mg/mL) en acetona, en una cubeta de 1 cm a 474 nm. La absorbancia esperada de la solución estándar A es de 0,525, lo que equivale a 5 mg de reactivo estándar de astaxantina en un volumen de dilución de 2000 mL.

20 Calcular las relaciones de respuestas de los picos del total de astaxantina a I.S. obtenida de la solución de ensayo B y Solución estándar B, por la fórmula: $(1,3P_{13-cis} + P_{trans} + 1,1P_{9-cis})/P_{IS}$.

25 en la cual P_{13-cis} , P_{trans} , P_{9-cis} y P_{IS} son las respuestas de pico de los isómeros de 13-cis-, trans-, 9-cis-astaxantina e IS, respectivamente, y 1,3 y 1,1 son los coeficientes de respuesta relativa de 13-cis-, y 9-cis-astaxantina respecto a transastaxantina, respectivamente.

Calcular el contenido de astaxantina (% p/p) en AstaREAL® L10 tomado por la fórmula: $C_{SA} (R_{AB}/R_{SB}) * 1000 / W * 100$

30 en la que C_{SA} es la concentración, en mg por mL, de astaxantina en la solución estándar A, 1000 es el volumen de dilución para la preparación del ensayo, W es el peso, en mg, de la muestra de AstaREAL® L10 tomada para la preparación de la solución de ensayo, y R_{AB} y R_{SB} son las relaciones de las respuestas máximas de astaxantina total a IS obtenidas de la Solución de ensayo B y de la solución estándar B, respectivamente.

Daño en el ADN.

35 El daño en el ADN se detectó mediante electroforesis en gel de una sola célula (ensayo cometa) basado en el método de Shen S y otros (Shen S, Cooley DM, Glickman LT, Glickman N, Waters DJ. Reducción del daño del ADN en el cerebro y en los linfocitos de sangre periférica de perros adultos mayores después del tratamiento con deshidroepiandrosterona (DHEA). Mutat Res. 2001 Sep 1; 480 - 481: 153 - 62). Para determinar la extensión del daño

5 del ADN basal, los PBL se suspendieron en agarosa de bajo punto de fusión en PBS a 37 °C y se pipetearon en un portaobjetos de microscopio de vidrio recubierto previamente con una capa de agarosa de punto de fusión normal. La capa final estaba compuesta por 80 µL de agarosa sola de bajo punto de fusión. Después de la solidificación de la agarosa, los portaobjetos se sumergieron en una solución de lisado en frío (NaCl 2,5 M, Na₂-EDTA 100 mM, Tris 10 mM y NaOH 300 mM para ajustar el pH a 10,0, DMSO al 10% y 1% de Triton X-100 añadido fresco) y almacenados en la oscuridad durante la noche a 4 °C. Luego se retiraron los portaobjetos de la solución de lisado y se colocaron en un tanque de electroforesis en gel horizontal (Fisher, Fair Lawn, NJ) que contenía tampón alcalino recién preparado (NaOH 300 mM y Na₂-EDTA 1 mM, pH > 13). Los portaobjetos permanecieron sumergidos en tampón durante 20 minutos antes de la electroforesis a 25 V y 300 mA durante 30 minutos. Después se lavaron tres veces los portaobjetos (5 min cada uno) con Tris 0,4 M a pH 7,5. Después del lavado final, los portaobjetos se drenaron y se expusieron a etanol al 100% frío para que se secaran. Todos los pasos desde la lisis celular hasta el final de la neutralización se realizaron en la oscuridad o bajo luz amarilla. Cada portaobjetos se tiñó con 150 µL de SYBR Green 1 (dilución 1: 10.000 en tampón TE a pH 7,5) antes del análisis. Para determinar si el tratamiento de los perros con antioxidantes afectaba a la sensibilidad de sus PBLs al estrés oxidante, se expusieron PBLs recién aislados de cada perro a H₂O₂ 25 µM durante 5 minutos a 4 °C antes de la suspensión en agarosa y electroforesis. Cada celda se puntuó visualmente en una escala de 0 a 4 de la siguiente manera:

- sin daños (tipo 0);
- daños leves a moderados (tipo 1 y 2),
- daño extenso del ADN (tipo 3 y 4).

20 La mención de cualquier documento no presupone que sea una técnica anterior con respecto a cualquier invención descrita o reivindicada en el presente documento o que solo, o en cualquier combinación con cualquier otra referencia o referencias, enseñe, sugiera o divulgue cualquier invención de este tipo. Además, en la medida en que cualquier significado o definición de un término en este documento esté en conflicto con cualquier significado o definición del mismo término en un documento incorporado por referencia, el significado o la definición asignados a ese término prevalecerá en este documento.

Aun cuando se han ilustrado y descrito realizaciones particulares de la presente invención, sería obvio para los expertos en la técnica que se pueden realizar otros cambios y modificaciones diferentes sin apartarse del alcance de la invención. Por tanto, se pretende cubrir en las reivindicaciones anexas todos los cambios y modificaciones que están dentro del alcance de esta invención.

30

REIVINDICACIONES

1. Una composición de alimento para mascotas que comprende al menos tres carotenoides, comprendiendo los al menos tres carotenoides astaxantina, beta-caroteno y luteína;
- 5 y en donde la astaxantina está presente en una cantidad de 0,1% a 25% en peso de los carotenoides y en donde la relación de beta-caroteno a luteína y a astaxantina es de 1:1:0,6 a 10:1:3,5, o de 1:1:0,6 a 1:10:3,5, o de 1:1:0,002 a 10:1:0,01, o de 1:1:0,002 a 1:10:0,01.
2. La composición de alimento para mascotas según la reivindicación 1, en la que la relación de beta-caroteno a luteína y a antaxantina es 4:1:1,5 o 2:1:1 o 2:1:0,5.
- 10 3. La composición de alimento para mascotas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición de alimento para mascotas se elige entre el grupo que consiste en una croqueta equilibrada nutricionalmente, un suplemento, una golosina, una galleta, una composición húmeda, y combinaciones y mezclas de los mismos.
- 15 4. La composición de alimento para mascotas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la cantidad total de carotenoides, en peso de la composición, es de 0,0005 a 0,025% para una composición de alimento para mascotas equilibrada nutricionalmente, o de 0,0001% a 0,01% para una composición de alimento para mascotas equilibrada nutricionalmente, o de 0,001% a 0,01% para una composición de alimento para mascotas equilibrada nutricionalmente, o de 0,001% a 0,005% para una composición de alimento para mascotas equilibrada nutricionalmente o de 0,002% a 0,003% para una composición de alimento para mascotas equilibrada nutricionalmente.
- 20 5. La composición de alimento para mascotas según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la cantidad total de carotenoides en peso de la composición es de 0,01% a 0,1% para un suplemento, o de 0,02% a 0,08% para un suplemento, o de 0,04% a 0,06% para un suplemento, tal como 0,0525%.