



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0607773-0 B1



(22) Data do Depósito: 24/02/2006

(45) Data de Concessão: 23/07/2019

(54) Título: MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE UM OLIGÔMERO DE PROANTOCIANIDINA

(51) Int.Cl.: C07D 311/62; A61K 8/00; A61Q 19/00; A61K 31/353; A61K 36/00; (...).

(30) Prioridade Unionista: 25/02/2005 JP 2005-051070.

(73) Titular(es): NAGASAKI UNIVERSITY; USAIEN PHARMACEUTICAL CO., LTD.; AMINO UP CO., LTD..

(72) Inventor(es): TAKASHI TANAKA; GEN-ICHIRO NONAKA; ISAO KOHNO; HAJIME FUJII; TAKASHI NAKAGAWA; HIROSHI NISHIOKA.

(57) Resumo: MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE UM OLIGÔMERO DE PROANTOCIANIDINA. A presente invenção refere-se a uma composição contendo como seu principal componente um oligômero de proantocianidina, ao qual se liga uma substância apresentando uma estrutura de anel de floroglicinol ou estrutura de anel de resorcinol, a qual reduz o peso molecular e que é obtida através do aquecimento de materiais de plantas contendo o polímero de proantocianidina ou extrato do mesmo, com uma substância apresentando uma estrutura de anel de floroglicinol ou estrutura de anel de resorcinol em uma solução aquosa ácida, a um método de produção da dita composição, e ao uso da dita composição em produtos para preservação da saúde e produtos farmacêuticos. De acordo com a invenção, o oligômero de proantocianidina tendo atividade fisiológica, ao qual uma substância apresentando uma estrutura de anel de floroglicinol ou estrutura de anel de resorcinol, se liga e tem peso molecular reduzido em um tal nível que o oligômero possa ser absorvido no corpo humano, o que foi convencionalmente difícil de se obter com alta produção de matérias-primas de plantas, pode ser eficiente e facilmente produzido.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE UM OLIGÔMERO DE PROANTOCIANIDINA**".

Campo Técnico

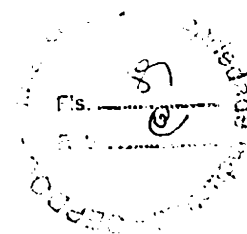
A presente invenção refere-se a um método de produção de um
5 oligômero de proantocianidina, o qual pode reduzir o peso molecular de um polímero de proantocianidina em uma planta, para um nível que pode ser facilmente absorvido pelo trato gastrointestinal em um corpo vivo.

Mais especificamente, a invenção refere-se a uma composição
contendo oligômero de proantocianidina, tendo um grau de polimerização de
10 2 a 4 e tendo uma estrutura de anel de floroglicinol ou uma estrutura de anel de resorcinol ligada no seu terminal, a qual é obtida mediante aquecimento de um material contendo um polímero de proantocianidina junto com uma substância que apresenta uma estrutura de anel de floroglicinol ou uma estrutura de anel de resorcinol em uma solução acídica, um método de produ-
15 ção da mesma, uso da composição e um novo oligômero de proantocianidina tendo uma estrutura de anel de floroglicinol ou estrutura de anel de resorcinol ligada ao mesmo.

A composição contendo o oligômero de proantocianidina obtido de acordo com a invenção pode ser usada em produtos alimentícios, produ-
20 tos alimentícios para melhoria da saúde, alimentos específicos para uso como alimento saudável, produtos cosméticos e produtos medicinais. Especificamente, a composição é de utilidade como uma composição para produtos alimentícios nutritivos e produtos medicinais para prevenção de doenças correlacionadas ao modo de vida causadas pela geração de tipos de oxigê-
25 nio reativos, prevenção e tratamento de doenças do cérebro ou prevenção do envelhecimento.

Antecedentes da Técnica

Devido ao excesso de ingestão de gordura, mudanças em nos-
sos hábitos de alimentação, aumento de exposição a raios UV devido à mu-
dança ambiental, diminuição da camada de ozônio e fatos similares, aumen-
30 to de poluentes ambientais e fatos similares, aumento das taxas de incidência das chamadas doenças correlacionadas ao modo de vida, tais como,



hiperlipemia, hipercolesteremia, pressão alta, diabetes e tipos de câncer, o aumento do número de pacientes com alergias ou com doenças do cérebro, como a demência, também está aumentando. Existe uma preocupação de que o número de pacientes com demência ou síndrome de Alzheimer cresça no futuro, devido ao rápido envelhecimento da sociedade. O envolvimento de tipos de oxigênio reativos gerados *in vivo* tem sido apontado como fator contributivo para essas doenças (Bioorganic & medicinal Chemistry, Volume 10 (2002), páginas 2497-2509; Documento Não-patente 1). No entanto, uma vez que uma perfeita tecnologia para suprimir ou controlar a geração de tipos de oxigênio reativos ainda não foi desenvolvida, ainda não se estabeleceu uma tecnologia médica suficientemente segura de utilidade no tratamento e prevenção de doenças correlacionadas ao modo de vida, doenças do cérebro e doenças similares.

Recentemente, substâncias naturais presentes nas plantas e exibindo atividades fisiológicas, especialmente, os compostos de polifenóis, têm atraído as atenções. Os polifenóis, que geralmente são contidos nos chás, vegetais, frutas, ervas e similares, podem ser esperados de ser ingeridos como alimento e bebida por um longo período de tempo e servem como agente de tratamento/prevenção, isentos de efeitos colaterais.

Os compostos de polifenóis, metabólitos secundários das plantas, os quais universalmente existem em grandes quantidades no mundo das plantas, são conhecidos por exibir diversas atividades fisiológicas, cuja atenção foi atraída antigamente para o campo de produtos farmacêuticos e para o campo da fitoquímica, tendo recentemente chamado a atenção no campo de alimentos saudáveis. Por exemplo, os polifenóis de chá, especialmente as catequinas, são conhecidos como tendo uma ampla faixa de atividades fisiológicas, como, propriedades antibióticas, ação antiviral, propriedade antimutagênica, efeito antioxidante, supressão do aumento da pressão sanguínea, propriedade de redução do colesterol no sangue, propriedade antiprostação, atividade antialérgica, melhoria da flora entérica, atividade de eliminação de odor e similares.

Dentre os polifenóis, as proantocianidinas são contidas em uma



faixa mais ampla de plantas. A fim de que as proantocianidinas exibam diversas atividades fisiológicas, o composto de proantocianidina precisa ser absorvido no corpo através do trato gastrointestinal. No entanto, os pesos moleculares das proantocianidinas são geralmente ditos como sendo da ordem de alguns milhares a várias dezenas de milhares. A substância tendo um peso molecular tão grande é difícil de ser absorvida pelo trato gastrointestinal e, em muitos casos, mesmo que seja ingerida, a substância não é absorvida no corpo vivo e não é usada como substância nutritiva.

O termo "proantocianidina" é um nome genérico para procianidina, prodelfinidina, propelargonidina e equivalentes de polímeros de dímero, trímero, tetrâmero, decâmero ou oligômeros maiores tendo como unidade constituinte flavan-3-ol (também referida como catequinas) e aquelas com ácido gálico esterificado nas mesmas e estereoisômeros das mesmas, que são compostos de polifenóis que geram antocianidinas mediante tratamento ácido. As unidades constituintes são ligadas entre si através da ligação carbono-carbono entre a posição 4 e a posição 8 da estrutura de carbono ou entre a posição 4 e a posição 6, ou, algumas vezes, através da ligação éter entre a posição 2 e a posição 7, além da ligação carbono-carbono.

A proantocianidina possui um excelente efeito antioxidante (Arch. Biochem. Biophys., Volume 374, páginas 347-355, 2000; Documento Não-patente 2) e, além disso, uma vez que tal composto oferece outros efeitos benéficos, tais como, melhoria da circulação do sangue, ação antiestresse, eficácia anti-hipertensão, efeito antibiótico, efeito antitumoral, atividade anti-catarata e efeito antidiarréico, o mesmo tem sido usado como uma substância derivada natural apresentando efeito de manutenção da saúde.

As proantocianidinas são isoladas como mistura de casca de pinheiro, fruto de maçã verde, sementes de uva e similares e, presentemente, são misturadas em bebidas, doces, alimentos saudáveis, produtos cosméticos, fármacos para o crescimento de cabelo e similares, os quais são comercialmente disponíveis.

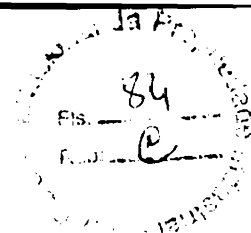
Em diversas plantas contendo proantocianidina, diversas proantocianidinas, desde aquelas que apresentam um baixo grau de polimeriza-



ção até aquelas que apresentam um alto peso molecular, são contidas como mistura e muitas das mesmas são plantas contendo principalmente proantocianidinas de alto grau de polimerização, tais como, caquizeiro, bananeira e marmeleiro Chinês. No entanto, entre as proantocianidinas, um polímero de proantocianidina tendo um alto grau de polimerização é dito como sendo inferior em atividade farmacológica a oligômeros de proantocianidina tendo grau de polimerização de 2 a 4, devido a sua fraca capacidade de absorção pelo intestino. Também, é preferível, que tal polímero de proantocianidina tendo forte adstringência e fraca solubilidade em água seja eliminado quando a planta é usada em produtos alimentares (Free Radical Res., Volume 29, páginas 351-358, 1998: Documento Não-patente 3). Com base nesses fatos, o oligômero de proantocianidina tendo um grau de polimerização de 2 a 4 tem chamado a atenção por apresentar excelente efeito de manutenção da saúde e aqueles derivados de casca de pinheiro são usados como bebidas e alimentos saudáveis.

A fim de se obter somente proantocianidina de extrato de plantas, são empregados métodos de absorção (ver, por exemplo, Documento de Patente 1, H06-49053) e similares. Entretanto, é difícil o isolamento daqueles de diferentes graus de polimerização. A fim de se obter apenas oligômeros de proantocianidina de grau de polimerização 2 a 4, o método de fracionamento de solvente, usando acetato de etila, o método de extração de fase sólida, usando acetato de metila, e o método de cromatografia (publicação do PCT, WO 00/64883; Documento de Patente 2), método de absorção de quitina (publicação do PCT, WO 03/091237; Documento de Patente 3), e similares são empregados, para isolamento de apenas proantocianidinas de baixo peso molecular, por meio de extração. No entanto, nesses métodos, uma grande quantidade de polímeros de proantocianidina de alto peso molecular é descartada, o que é desvantajoso, em termos de rendimento.

Como um método alternativo para substituição dos métodos de isolamento de oligômeros de proantocianidina de grau de polimerização 2 a 4 de plantas contendo polímeros de proantocianidina, os presentes inventores propuseram um método de reagir material contendo polímero de proan-



tocianidina com um composto contendo SH, tal como, cisteína, em uma solução ácida, de modo a reduzir o peso molecular do oligômero de proantocianidina (Publicação do PCT, WO 2004/103988; Documento de Patente 4). De acordo com o presente método, o oligômero de proantocianidina tendo cisteína ligada ao mesmo, para, desse modo, reduzir o peso molecular e ser excelente na absorção sistêmica, pode ser obtido. Foi confirmado que o oligômero de proantocianidina não apresenta toxicidade e pode ser usado seguramente. Entretanto, em alguns países (inclusive o Japão), no presente momento, existe um problema em que são exigidos procedimentos severos para obtenção de aprovação de usos de produtos de alimentos saudáveis contendo proantocianidina, tendo cisteína fixada ao mesmo, que é uma substância química não-natural.

- Documento de Patente 1: Pedido de Patente Japonês Aberto à Inspeção Pública No. H06-49053;
- Documento de Patente 2: Publicação do PCT, No. WO 00/64883;
- Documento de Patente 3: Publicação do PCT, No. WO 03/091237;
- Documento de Patente 4: Publicação do PCT, No. WO 04/103988;
- Documento Não-patente 1: Bioorganic & Medicinal Chemistry, Volume 10 (2002), páginas 2497-2509;
- Documento Não-patente 2: Arch. Biochem. Biophys., Volume 374, páginas 347-355, 2000;
- Documento Não-patente 3: Free Radical Res., Volume 29, páginas 351-358, 1998.

Descrição da Invenção

Problemas a serem Solucionados pela Invenção

O objetivo da invenção é proporcionar um conveniente e eficiente método para reduzir o peso molecular de um oligômero de proantocianidina, o qual é amplamente distribuído na natureza como polímero de proantocianidina, mas limitado em materiais naturalmente derivados como oligômeros, mediante uso como material de partida de um polímero de proantocianidina, planta contendo polímero de proantocianidina ou extrato das mesmas e ligação do material a uma substância que apresenta uma estrutura de anel



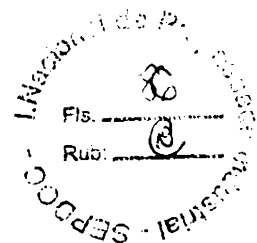
de floroglicinol ou estrutura de anel de resorcinol.

Meios para Solucionar o Problema

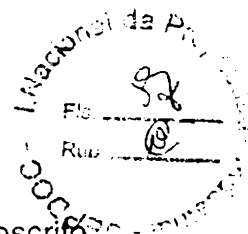
Com o propósito de alcançar o objetivo acima, os presentes inventores realizaram intensas pesquisas e, como resultado, descobriram que a proantocianidina pode ser fracionada e reduzida em seu peso molecular e, ao mesmo tempo, pode ser convertida em oligômero de proantocianidina tendo catequina ligada ao terminal do mesmo, mediante suave fervura de frutos, casca de frutos, cascas, folhas ou extratos das mesmas contendo o polímero de proantocianidina, tais como, tamareira, bananeira, videira, pinheiro, *Chamaecyparis obtuse*, árvore de cânfora, árvore da cera, marmeleiro Chinês, lechia, *Myrica rubra* e *Cinnamomi cortex*, juntamente com folhas de chá verde ou chá fresco contendo uma grande quantidade de catequinas de baixo peso molecular, em uma solução ácida, durante o período de 2 a 3 horas.

Além disso, os presentes inventores descobriram que a proantocianidina pode ser fracionada, reduzida em seu peso molecular e convertida em oligômero de proantocianidina, tendo uma substância apresentando uma estrutura de anel de floroglicinol ou uma estrutura de anel de resorcinol ligada ao mesmo, mediante uso da substância que apresenta a estrutura de anel de floroglicinol ou estrutura de anel de resorcinol e outras matérias de plantas (tais como, sementes e cascas de uvas) contendo a dita substância, além de folhas de chá verde ou chá fresco, tendo se completado a invenção com base nessas descobertas.

Assim, a presente invenção se refere aos itens 1 a 14 a seguir, uma composição contendo como seu componente principal o oligômero de proantocianidina, em cujo terminal se liga uma substância apresentando uma estrutura de anel de floroglicinol ou estrutura de anel de resorcinol, mediante aquecimento de uma amostra de planta contendo polímero de proantocianidina ou extrato da mesma, com folhas de chá verde ou de chá fresco em uma solução ácida (itens 1 a 5), métodos de produção da mesma (itens 6 a 9), uso da composição (itens 10 a 12) e um novo oligômero de proantocianidina (itens 13 a 14).



1. Uma composição contendo como seu principal componente um oligômero de proantocianidina, em cujo terminal se liga uma substância de peso molecular reduzido apresentando uma estrutura de anel de floroglicinol ou uma estrutura de anel de resorcinol, a qual é obtida mediante aquecimento de materiais de plantas contendo polímero de proantocianidina ou extrato das mesmas, com uma substância apresentando uma estrutura de anel de floroglicinol ou uma estrutura de anel de resorcinol, aquecimento da própria planta contendo tais substâncias ou extratos das mesmas, em uma solução acídica.
2. A composição contendo como seu principal componente um oligômero de proantocianidina, conforme descrito no item 1, em que a planta contendo o polímero de proantocianidina é, pelo menos, um tipo de planta selecionado do grupo que consiste de videira, pinheiro, *Chamaecyparis obtusa*, árvore da cânfora, árvore da cera, cacaueiro, tamareira, bananeira, marmeleiro Chinês, macieira, espinheiro, lechia, *Myrica rubra* e *Cinnamomi cortex*.
3. A composição contendo como seu principal componente um oligômero de proantocianidina, conforme descrito no item 1, em que a substância apresentando uma estrutura de anel de floroglicinol ou uma estrutura de anel de resorcinol é, pelo menos, um tipo de substância selecionado do grupo que consiste de resveratrol, floroglicinol, flavonóide e flavanóide (éster galoílico de catequina).
4. A composição contendo como seu principal componente um oligômero de proantocianidina, conforme descrito no item 1, em que a substância apresentando uma estrutura de anel de floroglicinol ou uma estrutura de anel de resorcinol é, pelo menos, um tipo de substância selecionado do grupo que consiste folhas de chá verde, chá fresco, semente de uva, casca de semente de uva, erva gambir, alga vermelha e extratos das mesmas.
5. A composição contendo como seu principal componente um oligômero de proantocianidina, conforme descrito no item 1, em que a composição apresenta um grau de polimerização de 2 a 4.
6. O método de produção da composição contendo como seu



principal componente um oligômero de proantocianidina, conforme descrito em quaisquer dos itens 1 a 5, compreendendo uma etapa de aquecimento de matérias de planta contendo um polímero de proantocianidina ou extrato das mesmas, com plantas apresentando uma estrutura de anel de floroglicinol ou uma estrutura de anel de resorcinol ou extrato das mesmas em uma solução ácida aquosa e uma etapa de concentração da solução reacional contendo o oligômero de proantocianidina de peso molecular reduzido, o qual apresenta uma estrutura de anel de floroglicinol ou estrutura de anel de resorcinol ligada aos seus terminais e posterior secagem da solução.

10 7. O método de produção da composição contendo como seu principal componente um oligômero de proantocianidina, conforme descrito em quaisquer dos itens 1 a 5, compreendendo a etapa de concentração da solução reacional contendo o oligômero de proantocianidina de peso molecular reduzido, o qual apresenta uma estrutura de anel de floroglicinol ou
15 estrutura de anel de resorcinol ligada aos seus terminais e uma etapa de submissão da solução concentrada a um tratamento por fracionamento.

 8. O método de produção de uma composição contendo como seu principal componente um oligômero de proantocianidina, conforme descrito nos itens 6 ou 7, em que a condição ácida é preparada mediante uso
20 de um ácido inorgânico, ácido orgânico ou de ambos.

 9. O método de produção de uma composição contendo como seu principal componente um oligômero de proantocianidina, conforme descrito no item 8, em que pelo menos um tipo de ácido é selecionado do grupo que consiste de ácido clorídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido acético,
25 ácido cítrico, ácido ascórbico e ácido málico.

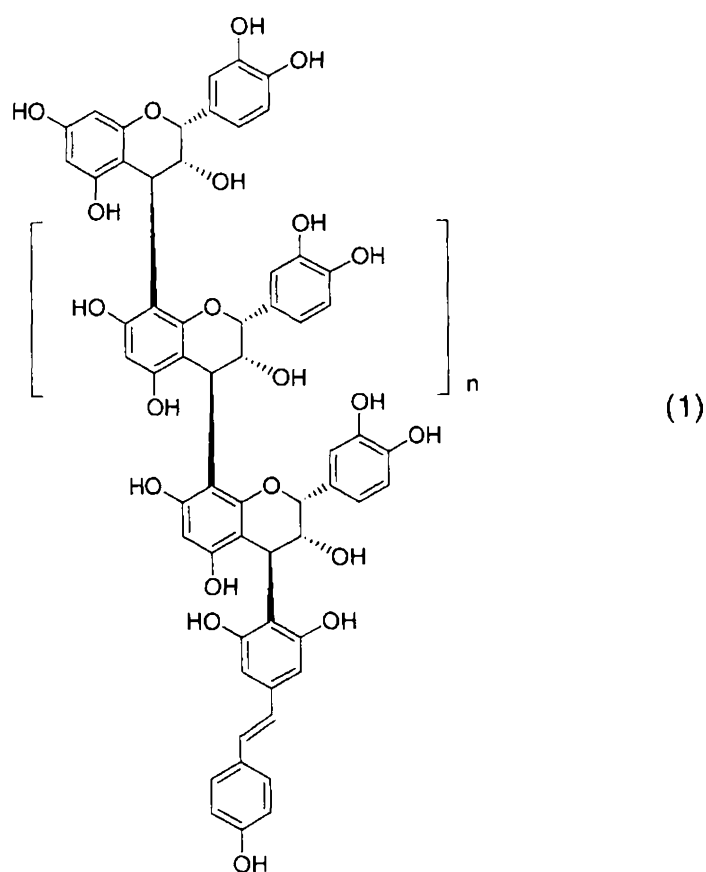
 10. A composição contendo oligômero de proantocianidina, conforme descrito em quaisquer dos itens 1 a 5, usada em produtos de alimento saudável, para o tratamento/prevenção de doenças correlacionadas ao modo de vida, causadas pela geração de tipos de oxigênio reativos, de doenças
30 do cérebro ou para prevenção do envelhecimento.

 11. A composição contendo oligômero de proantocianidina, conforme descrito no item 10, usada em produtos farmacêuticos destinados ao

tratamento/prevenção de doenças correlacionadas ao modo de vida, causadas pela geração de tipos de oxigênio reativos, de doenças do cérebro ou para prevenção do envelhecimento.

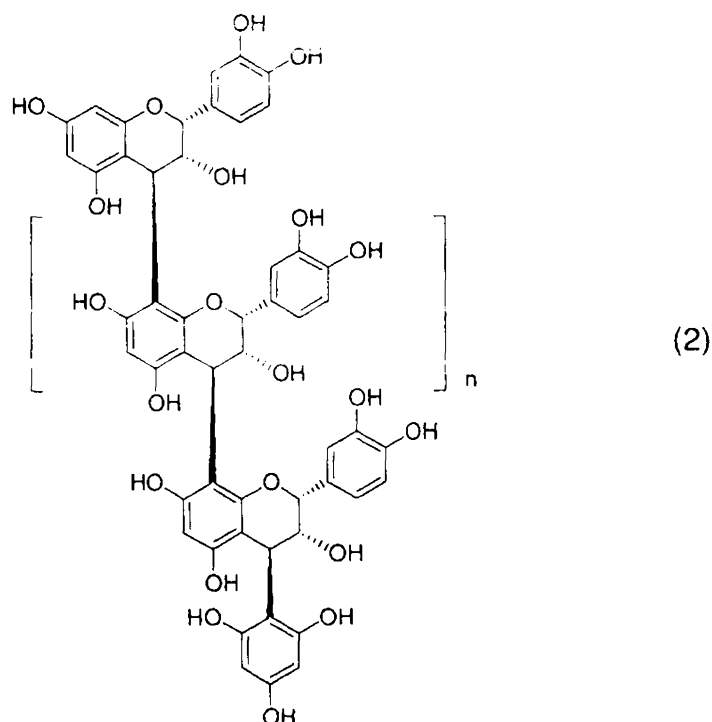
12. A composição contendo oligômero de proantocianidina, conforme descrito no item 10, usada em produtos cosméticos destinados à prevenção de envelhecimento, causado pela geração de tipos de oxigênio reativos.

13. Oligômero de proantocianidina, representado pela fórmula (1):



em que n é 0 ou um número inteiro de 1 a 2.

- 10 14. Oligômero de proantocianidina, representado pela fórmula (1) abaixo:



na fórmula, n é 0 ou um número inteiro de 1 a 2.

Eficácia da Invenção

A invenção proporciona um método para produção de uma composição contendo como seu principal componente um oligômero de proantocianidina, ao qual uma substância apresentando uma estrutura de anel de floroglicinol ou uma estrutura de anel de resorcinol foi ligada nos seus terminais, dessa forma, reduzindo o seu peso molecular, cuja composição é obtida mediante concentração e secagem de uma solução reacional obtida através do aquecimento de matérias de plantas contendo polímero de proantocianidina ou extrato das mesmas, com uma substância de plantas apresentando uma estrutura de anel de floroglicinol ou estrutura de anel de resorcinol ou extrato das mesmas em uma solução acídica aquosa. De acordo com a invenção, o oligômero de proantocianidina, ao qual uma substância apresentando uma estrutura de anel de floroglicinol ou uma estrutura de anel de resorcinol foi ligada nos seus terminais, dessa forma, reduzindo o seu peso molecular, e que é de utilidade como uma composição para produtos de alimento saudável e produtos farmacêuticos para tratamento/prevenção de doenças correlacionadas ao modo de vida, causadas pela geração de tipos de oxigênio reativos, e de doenças do cérebro ou para prevenção do envelhecimento.



lhecimento, pode ser eficientemente produzido a partir de materiais contendo o polímero de proantocianidina.

Melhor Modo de Realização da Invenção

A seguir, a invenção será descrita em maiores detalhes. As matérias-primas usadas para produção do oligômero de proantocianidina, de acordo com o método da presente invenção, incluem as plantas contendo o polímero de proantocianidina (tais como, frutos, casca de frutos, cascas e folhas) ou extratos das mesmas.

Na presente invenção, exemplos de plantas contendo polímero de proantocianidina incluem os frutos vegetais, tais como, de caquizeiro adstringente, banana, maçã, pêra, uva, morango, *persea americana*, mirtilo produtor de bagos azuis, espinheiro, raiz de lótus, trigo-mouro, lechia e *Myrica rubra*, ervas, condimentos, madeira, *Cinnamomi cortex* e pinheiro enjeitado. Dentre estes, as plantas de caquizeiro adstringente, banana, uva, pinheiro, *Chamaecyparis obtusa*, árvore da cânfora, árvore da cera, marmeleiro Chines, lechia e *Myrica rubra* são preferivelmente usados.

Na presente invenção, essas plantas contendo polímero de proantocianidina são cortadas em pequenos pedaços ou moídas, depois as mesmas são usadas e os extratos obtidos mediante aquecimento e concentração/secagem desses materiais em solvente aquoso são usados.

Não existe particular limitação quanto à substância que apresenta uma estrutura de anel de floriglicinol ou uma estrutura de anel de resorcinol usada na reação da presente invenção, na medida em que a substância é uma planta que contém resveratrol, floriglicinol, flavonóide e flavanóide (éster galoílico de catequina) ou extrato da mesma. Exemplos de tais substâncias incluem folhas de chá verde, chá fresco, semente de uvas, casca da semente de uva, erva gambir, alga vermelha e extratos das mesmas. Dentre estas, considerando que os usos principais do oligômero de proantocianidina produzido na presente invenção se constituem em produtos de alimento saudável, ingredientes para alimentos para uso específico de saúde, produtos cosméticos e produtos farmacêuticos, especialmente alimentos para uso específico de saúde, e produtos farmacêuticos, a semente de uva, casca de



semente de uva, folhas de chá verde e chá fresco e extratos das mesmas, os quais foram convencionalmente aplicados em bebidas, cuja segurança dos mesmos foi confirmada, são preferidos.

5 A proporção de materiais de planta contendo polímero de proantocianidina e substâncias apresentando uma estrutura de anel de floroglicinol ou estrutura de anel de resorcinol usada na reação é arbitrariamente selecionada. É preferido que a quantidade desta última seja grande o suficiente para unir os fragmentos do polímero de proantocianidina tendo reduzido peso molecular. Se a quantidade de substância apresentando uma estrutura de
10 anel de floroglicinol ou uma estrutura de anel de resorcinol for demasiadamente pequena, a proantocianidina tendo um alto peso molecular pode permanecer não-reagida e, nesse caso, a proantocianidina restante tendo um alto peso molecular pode ser facilmente removida por meio de cromatografia de coluna.

15 A reação entre a planta contendo proantocianidinas ou proantocianidinas contidas nos extratos das mesmas e a substância apresentando uma estrutura de anel de floroglicinol ou uma estrutura de anel de resorcinol (daqui em diante, algumas vezes, simplesmente referida como "substância contendo anel de floro/resorcinol") é conduzida em um solvente por meio de
20 aquecimento.

Como solvente de reação, são usados água, metanol, etanol e uma mistura de dois ou mais dos mesmos. Levando-se em consideração que o produto é usado em alimentos ou produtos farmacêuticos, a água e etanol são preferidos.

25 É preferido que a reação seja realizada sob uma condição ácida. Um ácido apropriadamente selecionado de ácidos inorgânicos, tal como, ácido clorídrico, ácido sulfúrico e ácido nítrico e ácidos orgânicos, tais como, ácido acético, ácido cítrico, ácido ascórbico e ácido málico, são usados em uma concentração de 0,1 a 1,0 N, preferivelmente, cerca de 0,5 N.

30 A reação entre um material de planta ou extrato de material de planta contendo proantocianidinas e uma substância contendo anel de floro/resorcinol é realizada a uma temperatura variando da temperatura ambi-



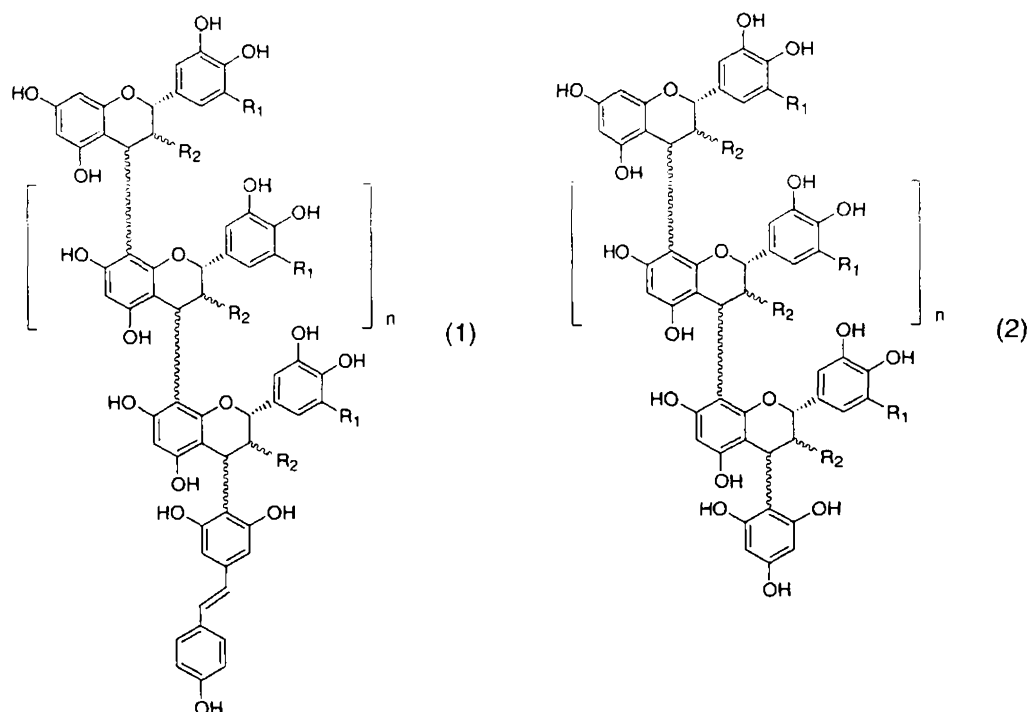
ente a 100°C, durante meia hora a uma semana, preferivelmente, a uma temperatura de 90 a 100°C, durante 1 a 4 horas.

A solução reacional após a reação, é submetida à filtração ou tratamento similar para remoção do teor de sólido e isolamento do líquido. O extrato resultante (líquido) contendo o oligômero de proantocianidina pode ser usado em diversas formas, tais como, líquida, forma de pó, gel, forma de produto sólido moldado ou formas similares, após ser condensado e seco. A solução reacional após a reação, pode ser concentrada e seca ou concentrada e fracionada. Mediante esses métodos, a substância-alvo é separada da solução reacional, concentrada e purificada por métodos convencionais. Por exemplo, os resíduos são separados mediante filtração e após o filtrado ser concentrado, o líquido concentrado pode ser purificado através da submissão do extrato a tratamento de filme (tal como, ultrafiltração e tratamento por osmose reversa) ou a um tratamento com adsorvente ou tratamento similar, dessa forma, concentrando e isolando a substância-alvo.

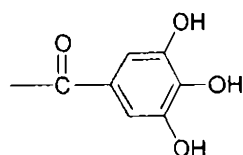
Exemplos de adsorventes incluem adsorvente de estireno-divinilbenzeno, adsorvente de ácido metacrílico, polímero hidrofílico de vinila, gel de dextrano modificado, gel de poliácridamida, sílica-gel de fase reversa e resina trocadora de íons. No caso em que tal adsorvente é usado, os oligômeros de proantocianidina que tiveram o peso molecular reduzido através da reação com a substância contendo anel de floro/resorcinol, são contidos na fração adsorvida ao adsorvente (daqui em diante, referida como "fração(ões) adsorvida(s)"). Ao eluir a fração adsorvida com álcool hidratado, álcool, acetona ou similares, os componentes tendo diversos pesos moleculares podem ser obtidos. Nessa ocasião, ao se isolar da solução reacional o oligômero de proantocianidina alvo tendo um grau de polimerização de 2 a 4, através de cromatografia de coluna usando adsorvente sintético à base de composto aromático, a proantocianidina de alto peso molecular pode ser removida e a concentração do eluato se torna fácil, o que é preferido. Exemplos preferidos de adsorvente sintético à base de composto aromático incluem polímero poroso reticulado à base de estireno, tal como, SEPABEADS.

Através de resultados das aferições usando ^1H -RMN, UV, HPLC,

GPC e TLC, se confirma que o oligômero de proantocianidina assim obtido contém de dímeros a tetrâmeros de proantocianidina, cuja estrutura química típica é representada pelas fórmulas (1) e (2):



- na fórmula, R_1 representa um átomo de hidrogênio ou um grupo hidroxila e
- 5 R_2 representa um átomo de hidrogênio ou um grupo hidroxila, R_2 representa um átomo de hidrogênio ou um grupo galoila,



e n representa 0 ou um número inteiro de 1 a 2.

- Embora nas fórmulas (1) e (2), somente as estruturas que são ligadas entre as posições 4 e 8 são mostradas, aquelas tendo ligação entre
- 10 as posições 4 e 6 ou entre as posições 2 e 7 também existem.

- Através da reação entre o polímero de proantocianidina e a substância contendo anel de floro/resorcinol conforme a invenção, o políme-
- ro de proantocianidina apresentando um alto peso molecular (5, em termos de grau de polimerização) e não absorvível no corpo humano, pode ser fa-
- 15 cilmente fragmentado, dessa forma, tornando o polímero uma substância de



baixo peso molecular absorvível e, ao mesmo tempo, podendo ser obtida uma composição contendo, principalmente, oligômeros de proantocianidina de dímeros a tetrâmeros.

O oligômero de proantocianidina tendo uma substância contendo
5 estrutura de anel de floro/resorcinol ligada ao seu terminal, obtida de acordo com a invenção, exibindo forte atividade antioxidante em testes de antioxi-
dação de DPPH, TEAC e FRAP, apresenta uma alta função antioxidante ao ser comparado com outros materiais de polifenóis. Além disso, em experi-
mentos com animais, considerando doenças correlacionadas ao modo de
10 vida e testes de monitoramento do índice de antioxição em seres huma-
nos, os dados evidenciam que a eficácia pode ser julgada com base na ati-
vidade antioxidante que foi obtida.

Consequentemente, os produtos contendo o oligômero de pro-
antocianidina da invenção na forma de ingrediente ativo, não apenas apre-
15 sentam uma ação de suprimir a geração de peróxido de lipídeo *in vivo*, co-
mo, também, atuam em doenças provocadas por oxidação induzida devido
ao oxigênio ativo. Portanto, os produtos que atuam na prevenção de diver-
sas deficiências de órgãos causadas pela geração de peróxido de lipídeo ou
oxigênio ativo e também previnem o envelhecimento, são eficazes na pre-
20 venção e tratamento de diversas doenças provocadas por tais deficiências
de órgãos e envelhecimento. Além disso, os produtos podem ser considera-
dos como sendo eficazes na supressão/prevenção/tratamento de disfunções
cerebrais, como a demência presumivelmente causada pelo envelhecimento
do cérebro. Ao mesmo tempo, junto com a melhoria nas funções cerebrais, o
25 aumento da função de aprendizado, facilidade de irritação, isonomia de alí-
vio, facilidade de inquietação e efeitos similares podem ser esperados. As-
sim, os produtos contendo o oligômero de proantocianidina da invenção na
forma de ingrediente ativo, podem ser usados em produtos de alimentos
saudáveis, produtos farmacêuticos, produtos cosméticos e similares.

30 Nenhuma toxicidade é observada com os produtos contendo o
oligômero de proantocianidina da invenção na forma de ingrediente ativo,
pelo que tais produtos podem ser usados de forma segura. Tais produtos

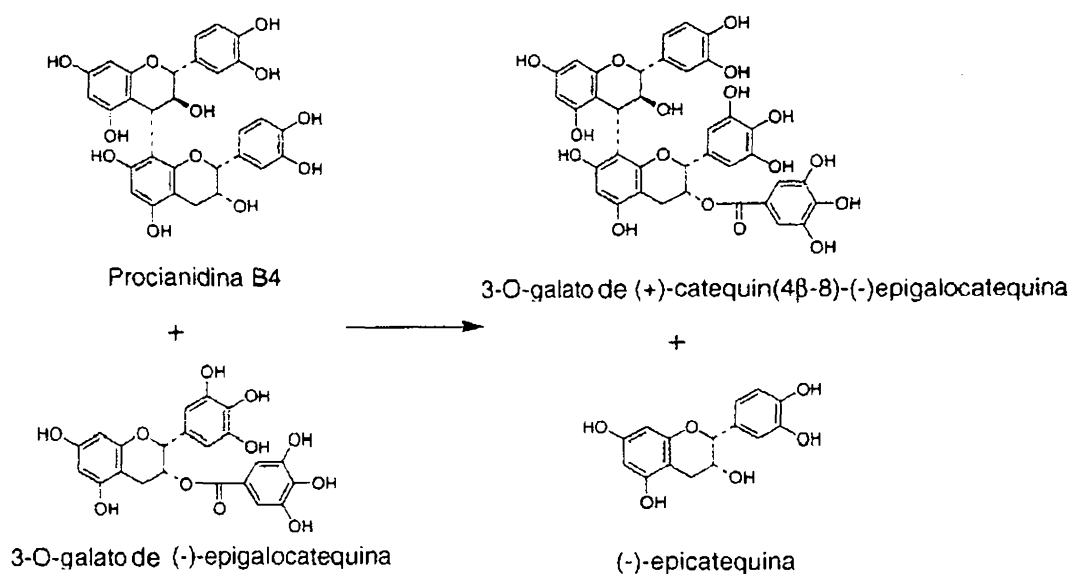


são administrados pelas vias oral ou parenteral. A quantidade de dosagem em caso de uso oral pode variar, dependendo da idade, peso, sintomas, efeito terapêutico alvo, método de administração e outros fatores similares. Geralmente, essa quantidade se situa na faixa de 50 a 1000 mg por dose, para os adultos. No caso de administração oral, os produtos da invenção são usados na forma de comprimidos, pílulas, cápsulas, pós, pós granulados, xarope e formas similares. No caso de administração parenteral, os produtos são usados na forma de solução injetável, agente de revestimento e formas similares. No caso de preparação de produtos granulados, produtos na forma de comprimidos ou de xarope, adequados agentes auxiliares (tais como, amidos, dextrina, agentes adoçantes, agentes de coloração e agentes aromatizantes) podem ser usados.

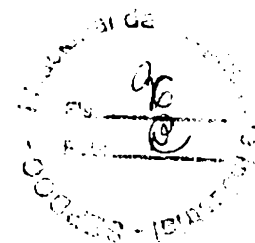
Exemplos

A seguir, a invenção será descrita, especificamente, fazendo-se referência aos Exemplos apresentados, entretanto, de nenhum modo, a invenção é limitada pelos mesmos.

Exemplo 1 de

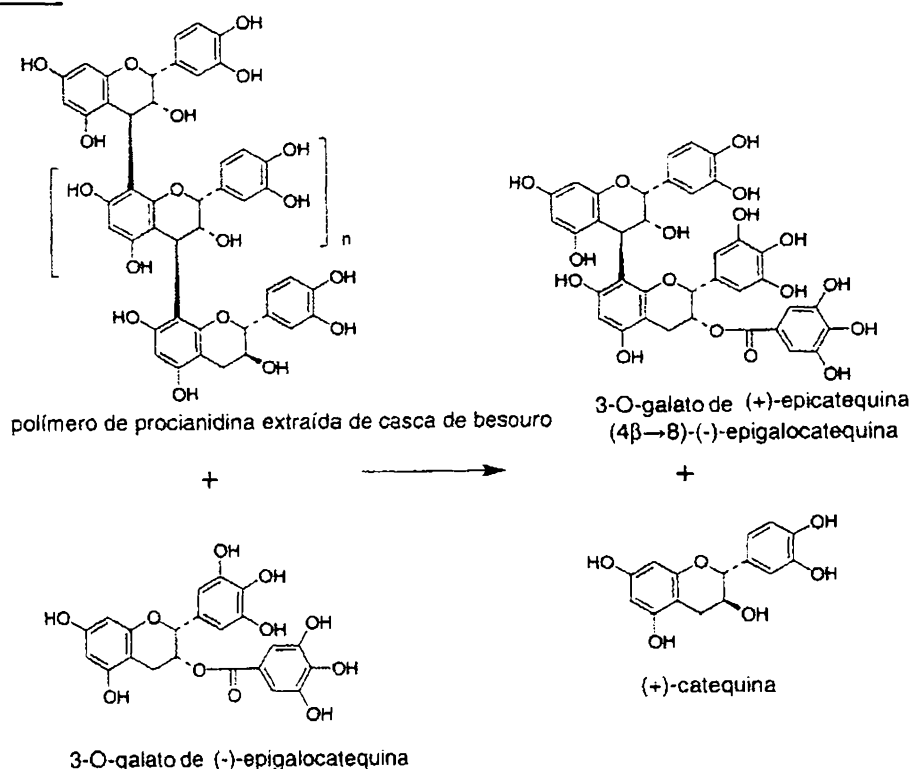


Procianidina B4 (100 mg) e 3-O-galato de epigallocatequina (100 mg) foram dissolvidas em 40 mL de uma solução de ácido cítrico a 2%, a qual foi aquecida à temperatura de 100°C durante 2 horas. Após resfriamento, a solução reacional foi submetida à coluna de cromatografia em gel MCI



CHP20P (metanol aquoso) e depois a uma coluna de cromatografia Sephadex LH-20 (metanol a 60%), para, dessa forma, recuperar como matéria-prima os compostos de procianidina B4 (10 mg) e 3-O-galato de epigallocatequina (59,2 mg), e também obter (-)-epicatequina (25,4 mg) e 3-O-galato de (+)-catequina (4 β →8)-(-)-epigallocatequina (17,3 mg). Ao comparar através do espectro de ^1H -RMN, a catequina gerada e a proantocianidina com composições do estado da técnica, foi realizada a identificação das composições obtidas (ver as fórmulas estruturais acima). de

Exemplo 2



0,5 g de polímero de procianidina extraído de casca de besouro e 3-O-galato de (-)-epigallocatequina (0,5 g) foram dissolvidos em 200 mL de solução de ácido cítrico a 2% e então aquecidos à temperatura de 95°C durante 3 horas. A solução reacional foi submetida à cromatografia de coluna da mesma maneira que no Exemplo 1, sendo obtido os compostos de 3-O-galato de epigallocatequina (403 mg), (+)-catequina recém-gerada (48,6 mg) e 3-O-galato de (-)-epicatequina (4 β →8)-(-)-epigallocatequina (148,3 mg), os quais constituem a proantocianidina (ver as fórmulas estruturais acima).



Exemplo 3

5 g de casca de cipreste Japonês contendo uma mistura de catequina e procianidina e 1 g de chá verde foram dissolvidos em 100 mL de uma solução de ácido cítrico a 2%, depois, aquecidos à temperatura de 95°C durante 3 horas. Após resfriamento, foram adicionados 100 mL de etanol à solução e a solução foi submetida à filtração por sucção. O filtrado foi analisado por meio de HPLC. As condições para a análise de HPLC foram as seguintes:

Coluna: Cosmosil 5C18 ARII (4,6 x 250 mm);

10 Temperatura da coluna: 35°C;

Fase Móvel A: ácido fosfórico a 50 mM;

Fase Móvel B: CH₃CN;

B: de 4% a 30% (durante 39 minutos);

de 30 a 75% (durante 15 minutos);

15 Vazão: 0,8 mL/min;

Deteção: deteção em sistema de fotodiodo.

5 g de casca de cipreste Japonês e 1 g de chá verde foram separadamente aquecidos em uma solução de ácido cítrico, sob as mesmas condições, depois, submetidos a tratamento por extração. A análise de H-PLC foi realizada da mesma maneira (ver HPLC na figura 1). Na solução do extrato obtida através do tratamento da mistura de casca de cipreste Japonês e chá verde na solução de ácido cítrico, foram obtidos picos derivados de diversos outros novos compostos, os quais não foram encontrados nos casos do tratamento da casca de cipreste Japonês e chá verde separadamente. É feita a suposição, mediante comparação por meio de espectro de absorção ultravioleta dos picos obtidos no presente Exemplo e aqueles obtidos nos Exemplos 1 e 2, de que todos os compostos eram compostos de proantocianidina.

30 O extrato líquido obtido no Exemplo 3, através do aquecimento da casca de cipreste Japonês e chá verde na solução de ácido cítrico, foi concentrado e depois submetido a fracionamento por solvente, com 50 mL de água e 50 mL de acetato de etila, por 5 vezes. A camada de acetato de



etila obtida foi coletada e também concentrada, de modo a se obter 0,67 g de produto extraído em acetato de etila. Os extratos obtidos, respectivamente, da casca de cipreste Japonês e chá verde tratados separadamente, foram, do mesmo modo, submetidos a fracionamento por solvente, obtendo-se, dessa forma, 0,30 g de produto extraído em acetato de etila da casca de cipreste Japonês e 0,37 g de produto extraído em acetato de etila de chá verde. Os três extratos em acetato de etila assim obtidos foram analisados por TLC. As condições para a realização do ensaio de TLC são as seguintes.

- 10 - sílica-gel 60;
- solvente de revelação: benzeno/formiato de etila/ácido fórmico (1/7/1, vol/vol);
- reagente de coloração: reagente de ácido vanilina-clorídrico (ver TLC na figura 2)

15 O reagente de ácido vanilina-clorídrico, que é um reagente de detecção para catequinas e proantocianidinas, toma uma cor de característica vermelha quando essas substâncias estão presentes. Com relação ao extrato obtido através do tratamento da casca de cipreste Japonês e chá verde na solução de ácido cítrico, pontos derivados de dímero e trímero de proantocianidinas foram reconhecidos.

20 Na camada de água restante após a separação do acetato de etila no Exemplo 3, permanece o composto de proantocianidina que apresenta um peso molecular mais alto que o peso molecular daquele transferido para a camada de acetato de etila. Depois, os pesos moleculares dos compostos acetilados de proantocianidina na camada de água foram comparados através de análise cromatográfica por permeação de gel. A camada de água restante da casca de cipreste Japonês e chá verde foi tratada com a solução de ácido cítrico e a camada de água da casca de cipreste Japonês foi concentrada e seca na forma de um sólido. Após ser dissolvida em anidrido acético-piridina, a solução foi deixada descansar à temperatura ambiente por 8 horas. A solução reacional foi, respectivamente, derramada em água gelada e a matéria insolúvel depositada foi retirada através de filtração



e seca a vácuo. O sólido acetilado obtido foi analisado sob as condições de uso de coluna de gel tipo TSK-GEL G4000H6, solvente de tetraidrofurano e detecção com 254 nm de absorção de UV. De acordo com o peso molecular dos produtos obtidos, estimados com base nas curvas de calibração preparadas mediante uso de benzeno e poliestirenos, tendo pesos moleculares de 4000, 25000 e 50000, o pico de topo da proantocianidina contida na camada de água depois do tratamento da casca de cipreste Japonês e chá verde na solução de ácido cítrico foi de cerca de 1300, enquanto o pico de topo da proantocianidina contida na camada de água da casca de cipreste Japonês foi de cerca de 2000. Foi descoberto que mediante adição de chá verde no tratamento com ácido cítrico, o peso molecular foi reduzido.

Exemplo 4

100 g de casca de banana fresca foram pulverizados junto com 300 mL de uma solução de mistura de acetona/água (4/1, vol/vol), mediante uso de um misturador do tipo turbilhonamento, com posterior submissão à filtração por sucção. A acetona foi destilada do filtrado mediante uso de um evaporador, para, dessa forma, preparar uma solução aquosa, a matéria insolúvel foi filtrada e foi adicionada água à solução, totalizando uma quantidade de água de 200 mL. Separadamente, 3 g de folhas de chá verde foram submetidos à extração através de fervura em 300 mL de água e, em seguida, a solução resultante foi submetida à filtração por sucção, se adicionou água, totalizando uma quantidade de água de 300 mL. 100 mL do extrato de banana (correspondendo a 50 g da casca da banana) e 100 mL do extrato de chá verde (correspondendo a 1 g de chá verde) foram misturados e 2 g de ácido cítrico foram dissolvidos na mistura. Depois, a mistura foi aquecida à temperatura de 95°C durante 3 horas. Após resfriamento, a solução foi extraída três vezes com acetato de etila, obtendo-se, dessa forma, 0,312 g do produto extraído em acetato de etila. Do mesmo modo, o extrato líquido de banana e o extrato líquido de chá verde foram separadamente submetidos ao fracionamento com acetato de etila, obtendo-se, dessa forma, respectivamente, 0,015 g e 0,18 g dos extratos em acetato de etila. Os extratos obtidos em acetato de etila foram analisados por meio de TLC (ver TLC na

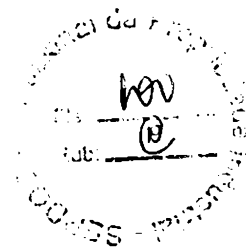


figura 3). Devido ao alto peso molecular do composto de proantocianidina no extrato de casca de banana, o extrato é positivo para o reagente de ácido vanilina-clorídrico somente no início da análise de TLC, enquanto que no produto obtido mediante o tratamento do extrato de casca de banana e extrato de chá verde com ácido cítrico, foram observados pontos derivados de novos dímeros e trímeros de proantocianidina, que não existiam nos extratos originais antes do tratamento.

Exemplo 5

O componente adstringente contido em uma grande quantidade em caquizeiro adstringente é o composto de proantocianidina tendo um peso molecular bastante alto e constituído de quatro tipos de catequinas de chá (Tanaka e outros, J. Chem. Soc., Perkin Trans., 1, 1013-1022, 1994). 100 g de fruto de caquizeiro verde fresco foram pulverizados com 500 mL de uma solução de ácido cítrico a 1% e 20 g de chá verde foram misturados, sendo a mistura suavemente fervida durante 3 horas. A solução reacional foi submetida à filtração por sucção enquanto quente, obtendo-se, dessa forma, 950 mL do filtrado. Metade do filtrado, 475 mL, foi submetida ao fracionamento 4 vezes com acetato de etila, obtendo-se, dessa forma, 2,56 g de uma camada de acetato de etila. A metade restante do filtrado, 475 mL, foi deixada passar através de uma coluna Sepabeads SP850 (200 mL), depois, lavada com água, para remover o açúcar, e os polifenóis adsorvidos foram eluídos com etanol a 40-60%. O eluato foi concentrado, obtendo-se, dessa forma, 3,26 g de uma fração contendo catequina e proantocianidina. Por outro lado, 200 g de fruto de caquizeiro verde foram pulverizados com 900 mL de uma solução misturada de acetona-água (4/1, vol/vol) e submetidos à extração. A acetona foi completamente destilada do filtrado e a solução de extrato obtida foi deixada passar através de uma coluna de Sepabeads SP850 (200 mL). Como resultado, a maior parte das proantocianidinas do caquizeiro (caquizeiro tannino) não foi adsorvida, apenas eluída com a água. A quantidade da fração de polifenol adsorvida à coluna e eluída com álcool aquoso foi bastante pequena, ou seja 0,76 g. O peso molecular da proantocianidina no caquizeiro é suposto de ser aproximadamente $1,38 \times 10^4$ (Matsuo T. e outros, Agric. Biol.

Chem , 42, 1637-1643, 1978), o qual é demasiadamente grande para entrar dentro dos poros da coluna de Sepabeads. Por outro lado, a proantocianidina de caqui tratado com chá verde, fracionada e reduzida no peso molecular, pode vir a entrar dentro dos poros da coluna de Sepabeads para ser adsorvida. Através do presente Exemplo, foi descoberto que a coluna de Sepabeads pode separar as proantocianidinas tendo altos pesos moleculares. O produto extraído em acetato de etila obtido mediante tratamento do caqui tratado com chá verde e ácido cítrico e a substância adsorvida à coluna de Sepabeads SP285 foram comparadas ao produto extraído em acetato de etila de chá verde e o extrato de acetona aquosa de caqui tratado verde, através do uso do ensaio de TLC (ver TLC, figura 4). Com relação à porção adsorvida à coluna de Sepabeads SP825, a análise de HPLC de fase normal foi realizada e a comparação foi feita com a fração de polifenol (contendo o monômero de catequina, dímero, trímero e tetrâmero de proantocianidina e proantocianidina tendo alto peso molecular) obtida mediante separação do produto extraído em água quente do cipreste Japonês, com o método de cromatografia de coluna, usando a coluna DIAION HP20SS (Ver HPLC, figura 5). As condições da análise de HPLC de fase normal foram as seguintes:

- coluna: LiChroCART Superspher Si 60 (4,6 x 250 mm);
- temperatura da coluna: 28°C;
- fase móvel: hexano/metanol/tetraidrofurano/trifluoroacetato (45/40/13,5/1,5);
- vazão: 1,0 mL/min;
- detecção: 254 nm.

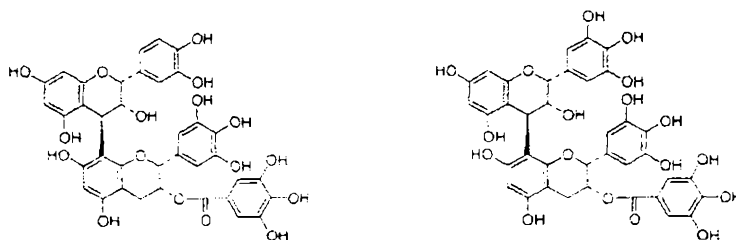
Como controles, foram usados monômero de (-)-epicatequina, dímero de procianidina B4, trímero de procianidina C1 e tetrâmero de cinantina A2. Esses controles foram separados das sementes de ameixeira e identificados mediante comparação dos espectros de ¹H-RMN com os valores descritos nas referências. No ensaio de HPLC, embora um pico para cafeína tenha sido observado e também tenha sido acordado que os polímeros de até quatro moléculas de monômeros estejam presentes, foram envolvidos menos segmentos de picos, se comparado com a proantocianidina do ci-

preste Japonês.

Exemplo 6

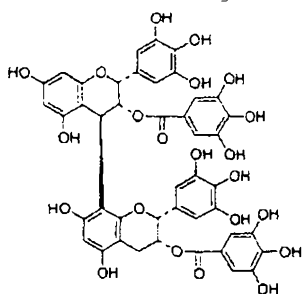
1 kg de fruto de caquizeiro verde fresco foi pulverizado com 2 L de água e o restante foi misturado com 200 g de chá verde e 80 g de ácido cítrico. Em seguida, foi adicionada água, totalizando uma quantidade de 8 L e a mistura foi suavemente fervida durante 3 horas. Após aquecimento, foi realizada filtração, enquanto quente. O filtrado obtido foi resfriado, deixado passar através de uma coluna de Sepabeads SP825 e lavado com água. A porção adsorvida foi eluída com etanol aquoso, concentrada e depois seca por congelamento, de modo a se obter 59,0 g de uma mistura de catequina-proantocianidina. Depois, 6 g da mistura obtida foram deixados passar através de uma coluna de Sephadex LH-20, fracionando a mistura em oito frações (ver a fig. 6). A quantidade obtida da fração 1, a qual principalmente continha epicatequina e epigallocatequina, foi de 0,79 g. A quantidade obtida da fração 2, a qual principalmente continha 3-O-galato epicatequina foi de 0,15 g. A quantidade obtida da fração 3, a qual principalmente continha 3-O-galato epigallocatequina, foi de 0,87 g. A quantidade obtida da fração 4, a qual continha uma mistura de epigallocatequina e dímero de proantocianidina, foi de 0,2 g. As quantidades obtidas das frações 5 e 6, que continham dímero de proantocianidina, foram de 0,25 g e 0,51 g, respectivamente. A quantidade obtida da fração 7, a qual principalmente continha trímero de proantocianidina, foi de 0,88 g. A quantidade obtida da fração 8, a qual continha o mesmo trímero da fração 7, ou proantocianidina de peso molecular mais alto que aquela, foi de 1,63 g. Entre essas frações, as frações 5 e 6 foram purificadas por meio de cromatografia de coluna com gel MCI CHP20P e cromatografia de coluna Chromatorex ODS (ambos usando metanol aquoso como solvente), obtendo-se, dessa forma, 101,6 mg de 3-O-galato de (-)-epicatequina ($4\beta \rightarrow 8$)-(-)-epigallocatequina, 121,1 mg de 3-O-galato de (-)-epigallocatequina ($4\beta \rightarrow 8$)-(-)-epigallocatequina e 24,3 mg de 3-O-galato de (-)-epigallocatequina ($4\beta \rightarrow 8$)-(-)-epigallocatequina 3-O-galato (ver as fórmulas estruturais seguintes). Além disso, diversos tipos de dímeros de proantocianidina estiveram presentes e os presentes inventores foram bem sucedidos na se-

paração pura dos três tipos acima, identificando suas estruturas mediante comparação do espectro de ^1H -RMN.



3-O-galato de (-)-epicatequina (4 β →8)-(-)-epigallocatequina;

3-O-galato de (-)-epigallocatequina (4 β →8)-(-)-epigallocatequina;



3-O-galato de (-)-epigallocatequina-3-O-galato (4 β →8)-(-)-epigallocatequina

Exemplo 7: Produção do Composto Ligado a Resveratrol

- 100 mg de pó de polifenol de semente de uva (Grape Seed P.E., produtos da Guilin Layn Natural Ingredients Corp., teor de proantocianidina:
- 5 95% ou mais) e 120 mg de resveratrol, juntamente com 100 mg de ácido cítrico, a mistura sendo dissolvida em 10 mL de água, colocada em água quente durante 3 horas (87 a 93°C) para permitir o prosseguimento da reação, a solução restante sendo deixada descansar para resfriar até a temperatura ambiente. Esse líquido foi introduzido em uma coluna Sephadex LH20
 - 10 (diâmetro interno de 2 cm, comprimento de 15 cm, cerca de 50 mL, metanol a 70%). Em seguida, 50 mL de metanol a 70% e 50 mL de metanol a 100% foram derramados sequencialmente para passar através da coluna, de modo a concentrar a fração da substância-alvo. Após tratamento por meio de secagem por congelamento, foram obtidos 6,0 mg de um pó (doravante, referido como Substância da Invenção A).
 - 15

Esse pó seco foi dissolvido em 1 mL de metanol a 70% e essa solução foi introduzida em uma coluna de gel MCI CHP20 (diâmetro interno de 2 cm, comprimento de 15 cm e cerca de 50 mL). 50 mL do mesmo solvente foram deixados passar através da coluna, de modo a concentrar a fra-

ção da substância alvo. Após tratamento por meio de secagem por congelamento, foram obtidos 2,4 mg de um pó. O pó obtido foi submetido à análise de HR-FAB-MS (Espectro de Massa por Bombardeio Rápido de Átomo de Alta Resolução) e análise de ^1H -RMN (Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio, ver a Tabela 1). O $[\text{M}]^+$ do composto obtido contido principalmente na fração foi observado em m/z :516,1404, no ensaio de HR-FAB-MS, o que coincidiu com o valor de 516,1420, correspondendo a uma fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{25}\text{O}_9$, com uma margem de erro de 3,1 ppm. Portanto, a fração foi suposta conter um composto representado pela fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{25}\text{O}_9$, o que levou a uma estrutura química que se considerou como resveratrol ligado à catequina ou epicatequina, através de ligação carbono-carbono.

No ensaio de ^1H -RMN (ver a Tabela 1) do composto, além dos sinais de cinco prótons no anel aromático, os quais são comuns nos compostos de catequina e epicatequina, foi observado um grupo de sinais tendo átomos de oxigênio nas bases em δ 5,04 (1H, br.s, 2-H) e em δ 4,01 (1H, br.s, 3-H), o que sugeriu a presença da configuração estérica da epicatequina. O sinal em δ 4,64 (1H, br.s) foi atribuído à posição 4a da porção de epicatequina e a porção de resveratrol foi suposta estar localizada na posição 4b. Além disso, foi observado um envelope em 2H tendo a mesma forma do sinal observado em δ 6,55 no composto de floroglicinol, desviando-se de 0,56 ppm do depósito inferior, mostrando que a recém-formada ligação c-c apresenta também um ambiente estérico similar. Além disso, foi observado o sistema AB da dupla ligação do conjugado tipo E, derivado de uma estrutura de transestilbeno de resveratrol (δ 6,79, 6,97, cada 1H, $J=16,5$ Hz), e sinal de A2B2 sobre os outros anéis aromáticos (δ 6,80, 7,36, cada 2H, $J=8,6$ Hz). Baseado na informação, a estrutura química do composto foi suposta como sendo de 4b-(4-resveratroil)-(-)-epicatequina, mostrada a seguir:

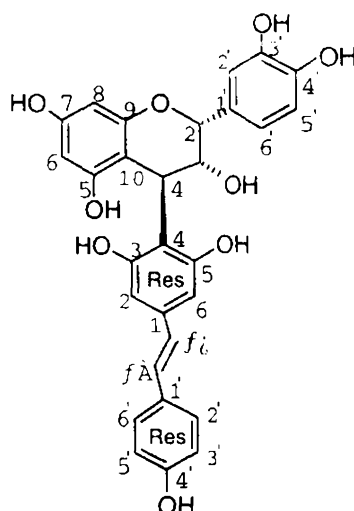


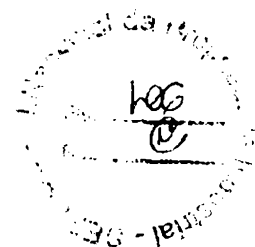
Tabela 1: Atribuição do Sinal de ^1H -RMN da Substância A da Invenção (δ em ppm)

H No.	
2-H	5,01 (br.s)
3-H	3,96 (br.s)
4-H	4,53 (br.s)
6-H	6,01 (d, $J=2,2$ Hz)
8-H	5,98 (d, $J=2,2$ Hz)
2'-H	6,96 (d, $J=1,7$ Hz)
5'-H	6,74 (d, $J=8,3$ Hz)
6'-H	6,67 (dd, $J=8,3, 1,7$ Hz)
Ph 4-H	5,99 (envelope)
6-H	5,99 (envelope)

Nota 1: a substância A da invenção foi medida em acetona – d_6 - D_2O .

Exemplo 8: Produção do Composto Ligado a Floroglicinol

- 5 Cada 1,00 g de polifenol de semente de uva e de floroglicinol foi dissolvido com 500 mg de ácido cítrico em 50 mL de água e a mistura foi colocada em água quente (87 a 93°C) durante 3 horas. Após a reação, a solução resultante foi deixada descansar para resfriar até a temperatura ambiente. Depois, essa solução foi introduzida em uma coluna DIAION HP20
- 10 (diâmetro interno de 3 cm, comprimento de 14 cm, cerca de 100 mL), sendo feita a lavagem com cerca de 300 mL de água. Em seguida, foi feita a elui-



ção com cerca de 200 mL de metanol e a fração-alvo foi concentrada por meio de secagem por congelamento, de modo a se obter 1,24 g de um pó (doravante, referido como Substância B da Invenção).

A substância B da invenção foi dissolvida em 5 mL de metanol a 5 70% e uma coluna Sephadex LH-20 (diâmetro interno de 3 cm, comprimento de 25 cm, cerca de 180 mL) foi carregada com a solução. 500 mL do mesmo solvente foram deixados passar através da coluna, e a fração-alvo foi concentrada por meio de secagem por congelamento, obtendo-se, dessa forma, 62,2 mg de um pó. O pó obtido foi submetido à análise de HR-FAB-MS e 10 análise de ^1H -RMN. O $[\text{M}]^+$ do composto obtido contido principalmente na fração foi observado em m/z : 414,0941, no ensaio de HR-FAB-MS, o que coincidiu com o valor calculado de 414,0950, correspondendo a uma fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_9$, com uma margem de erro de 2,2 ppm (um erro de 10 ppm ou menos é admissível). Portanto, o composto foi suposto como tendo 15 uma fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_9$, o que sugeriu uma estrutura química em que o floroglicinol foi ligado à catequina ou epicatequina através de ligação carbono-carbono. No ensaio de ^1H -RMN do composto (ver a Tabela 2), além dos sinais de cinco prótons no anel aromático, os quais são comuns nos compostos de catequina e epicatequina, foi observado um grupo de sinais 20 tendo átomos de oxigênio nas bases em 5,01 (1H, br.s, 2-H) e em 3,96 (1H, br.s, 3-H), o que sugeriu que o composto tinha uma configuração estérica da epicatequina. Foi suposto que o sinal de próton em δ 4,53 (1H, br.s) foi atribuído à posição 4a da porção de epicatequina e que a porção de floroglicinol foi localizada na posição 4b. Além disso, um sinal atribuível a derivados c-4 25 e c-6 de floroglicinol em 2H foi observado em δ 5,99 como envelope equivalente, sugerindo que a recém-formada ligação c-c gerou uma barreira de rotação. Baseado nessa informação, a estrutura química do composto foi suposta como sendo de 4-(2-floroglicinol)-(-)-epicatequina, conforme mostrado na fórmula seguinte. A análise de ^{13}C -RMN (Espectro de Ressonância Magnética Nuclear no Carbono 13, ver a tabela 3) confirmou a estrutura 30 química.

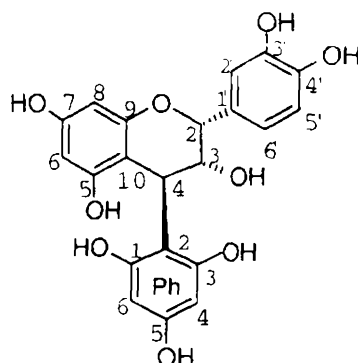


Tabela 2: Atribuição do Sinal de ^1H -RMN da Substância B da Invenção (δ em ppm)

H No.	
2-H	5,04 (br.s)
3-H	4,01 (br.s)
4-H	4,64 (br.s)
6-H	6,00 (d, $J=2,2$ Hz)
8-H	6,02 (d, $J=2,2$ Hz)
2'-H	6,97 (d, $J=1,7$ Hz)
5'-H	6,74 (d, $J=8,3$ Hz)
6'-H	6,67 (dd, $J=8,3, 1,7$ Hz)
Res 2 e 6-H	6,55 (envelope)
α -H	6,79 (d, $J=16,5$ Hz) ^{a)}
β -H	6,97 (d, $J=16,5$ Hz) ^{a)}
2'e 6'-H	6,80 (d, $J=8,6$ Hz) ^{c)}
3'e 5'-H	7,36 (d, $J=8,6$ Hz) ^{c)}

Nota 1: a substância B da invenção foi medida em acetona - d_6 - D_2O

Nota 2: Se a mesma letra estiver anexa à direita dos parênteses, a atribuição

5 pode ser trocada entre si.



Tabela 3: Atribuição do Sinal de ^{13}C -RMN da Substância B da Invenção (δ em ppm)

C No.	
C - 2	76,8
- 3	72,3
- 4	36,7
- 5	157,7 ^{a)}
- 6	95,4
- 7	158,4 ^{b)}
- 8	96
-9	158,5 ^{b)}
-10	100,3
- 1'	132,2
- 2'	115
- 3'	145,0 ^{c)}
- 4'	145,3 ^{c)}
- 5'	115,1
- 6'	119
Ph - 1	157,7 ^{a)}
- 2	100,3
- 3	157,5 ^{a)}
- 4	106,6
- 5	157,7 ^{a)}
- 6	106,6

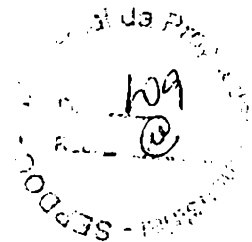
Nota 1: a substância B da invenção foi medida em acetona - d_6 - D_2O

Nota 2: Se a mesma letra estiver anexa à direita dos parênteses, a atribuição pode ser trocada entre si.

5

Exemplo 9: Produção de Composto tendo galato de Epigallocatequina (EGCG) derivado de Semente de Uva ligado ao mesmo

5,00 g de pó de polifenol de semente de uva (Grape Seed P.E., Layn, teor de proantocianidina de 95%), foram dispersos e dissolvidos em



cerca de 100 mL de água e depois a solução foi introduzida em uma coluna de Sepabeads SP850 (diâmetro interno de 3,8 cm, comprimento de 20 cm, cerca de 230 mL) e eluída em água. A fração obtida foi concentrada e seca por congelamento, de modo a se obter 2,44 g de um pó de polímero (48,8 %).

- 5 Cada 1,00 g do polímero de polifenol de semente de uva e de EGCG obtido foi dissolvido com 500 mg de ácido cítrico em 50 mL de água e o reator contendo a mistura foi colocado em água quente (87 a 93°C) durante três horas. Após a reação, a solução foi deixada descansar para resfriar até a temperatura ambiente. Depois, essa solução foi introduzida em uma
- 10 coluna DIAION HP20 (diâmetro interno de 3 cm, comprimento de 14 cm, cerca de 100 mL), sendo feita a lavagem com cerca de 300 mL de água. A fração obtida através de eluição com cerca de 200 mL de metanol foi concentrada por meio de secagem por congelamento, de modo a se obter 1,85 g de um pó (doravante, referido como Substância C da Invenção).

- 15 Exemplo 10: Produção de Composto tendo Polifenol de *Myrica* Cortex (polímero de EGCG) ligado ao mesmo.

- Um pedaço de árvore da cera (*Myricaceae*), e um pedaço de casca de *Myrica rubra* (*Myricaceae*), isto é, "*Myrica* Cortex", foram imersos em acetona fria a 50%, por 5 a 10 vezes (peso/volume) durante 3 a 7 dias,
- 20 obtendo-se, dessa forma, um líquido de extrato marrom escuro. O líquido obtido foi concentrado e cristais amarelos de miricitrina (miricetin 3-O- α -L-ramnopiranosídeo) foram filtrados repetidamente mediante uso de filtro de papel. O filtrado obtido, depois de adicional concentração, foi seco por congelamento, de modo a se obter um pó marrom escuro, com um rendimento
- 25 de 14% da porção de resina. Em seguida, 14,0 g desse pó foram dissolvidos em aproximadamente 70 mL de metanol a 50% e uma coluna Sephadex LH-20 (diâmetro interno de 5 cm, comprimento de 20 cm, cerca de 400 mL) foi carregada com a solução. Em seguida, 1,5 L do mesmo solvente e 0,7 L de metanol a 70% foram deixados passar através da coluna, além de 1 L de
- 30 acetona a 70%, de modo a recuperar a fração de polímero de EGCG. A fração obtida foi concentrada e seca por congelamento, de modo a se obter 9,37 g de um pó de polímero de EGCG (66,9%). Cada 1 g de polímero de



EGCG derivado de Myrica Cortex e EGCG foi dissolvido com 500 mg de ácido cítrico em 50 mL de água e o recipiente contendo a mistura foi colocado em água quente (87 a 93°C) durante três horas. Após a reação, a solução resultante foi deixada descansar para resfriar até a temperatura ambiente.

- 5 Depois, essa solução foi introduzida em uma coluna DIAION HP20 (diâmetro interno de 3 cm, comprimento de 14 cm, cerca de 100 mL), sendo feita a lavagem com cerca de 300 mL de água. A fração obtida através de eluição com cerca de 200 mL de metanol foi concentrada por meio de secagem por congelamento, de modo a se obter 1,85 g de um pó (doravante, referido como Substância D da Invenção).

Exemplo 11: Produção de Composto derivado de casca de Caquizeiro tendo Polifenol de Chá ligado ao mesmo.

- 1,00 g de pó seco de casca de caquizeiro e 300 mg de extrato de chá (PF-TP 90, fabricado pela Pharma Foods International Co. Ltda., teor de polifenol de chá: 90% ou mais; teor total de catequina: 80% ou mais (com teor de EGCG de 50% ou mais)) foram dissolvidos com 500 mg de ácido cítrico em 50 mL de água e o reator contendo a mistura foi colocado em água quente (87 a 93°C) durante três horas. Após a reação, a solução foi deixada descansar para resfriar até a temperatura ambiente. Depois, essa solução foi introduzida em uma coluna Sepabeads SP850 (diâmetro interno de 3 cm, comprimento de 14 cm, cerca de 100 mL), sendo feita a lavagem com cerca de 300 mL de água e a eluição com cerca de 200 mL de metanol. Em seguida, essa fração foi introduzida em uma coluna DIAION HP20 (diâmetro interno de 3 cm, comprimento de 14 cm, cerca de 100 mL), sendo feita a lavagem com cerca de 300 mL de água. Depois, a fração obtida através de eluição com cerca de 200 mL de metanol foi concentrada e seca por meio de congelamento, de modo a se obter 464 mg de um pó (doravante, referido como Substância E da Invenção).

- Exemplo 12: Produção de Composto tendo Polifenol derivado de lechia (galato de epigallocatequina) ligado ao mesmo.

5,00 g de pó de polifenol de semente de lechia (Litchi P.E., produto da Guilin Layn Natural Ingredients Corp., teor de proantocianidina: 90%



ou mais) foram dispersos e dissolvidos em cerca de 100 mL de água e essa mistura foi introduzida em uma coluna Sepabeads SP850 (diâmetro interno de 3,8 cm, comprimento de 20 cm, cerca de 230 mL). A fração obtida através de eluição com água foi concentrada e seca por meio de congelamento, de modo a se obter 3,02 g de um pó de polímero (60,4%).

Cada 1 g de pó de polímero de polifenol de semente de lechia obtida e EGCG foi dissolvido com 500 mg de ácido cítrico em 50 mL de água e o reator contendo a mistura foi colocado em água quente (87 a 93°C) durante três horas. Após a reação, a solução resultante foi deixada descansar para resfriar até a temperatura ambiente. Depois, essa solução foi introduzida em uma coluna DIAION HP20 (diâmetro interno de 3 cm, comprimento de 14 cm, cerca de 100 mL), sendo feita a lavagem com cerca de 300 mL de água. A fração obtida através de eluição com cerca de 200 mL de água foi concentrada e seca por meio de congelamento, de modo a se obter 1,80 g de um pó (doravante, referido como Substância F da Invenção).

Exemplo de Teste 1

Com relação às substâncias A a E obtidas, respectivamente, nos Exemplos 7 a 11, foram realizados testes de avaliação quanto às propriedades antioxidantes, através da medição da atividade de purificação do radical 1,1-difenil-2-picrilidrazila (DPPH) e do método de TEAC (Capacidade Antioxidante Equivalente de Trolox).

Ensaio de DPPH

Procedimentos:

Com relação a cada amostra, a atividade de purificação do radical 1,1-difenil-2-picrilidrazila (DPPH) foi avaliada como segue. Em uma microplaca de 96 cavidades, foram colocados 100 μ L da solução de DPPH (solução de etanol, 60 μ M). Depois, se adicionou 100 μ L da solução de etanol da amostra de teste ou 100 μ L de etanol como controle e a mistura foi suavemente misturada, deixando-se descansar à temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, foi medida a absorbância em 520 nm. A atividade de purificação do radical DPPH foi calculada através da fórmula seguinte e uma concentração eficaz a 50% (EC₅₀) foi calculada a partir dos valores da ativi-



dade de purificação do radical DPPH da amostra de teste, gradualmente diluída e da sua concentração.

% de atividade de purificação do radical DPPH = $(1 - \text{absorbância da amostra de teste}) / \text{absorbância do controle} \times 100$

5 Como substância a ser comparada com a substância A da invenção, foram usados os compostos de epicatequina (EP) e resveratrol (RS). Como substância a ser comparada com a substância B da invenção, foram usados os compostos de epicatequina e floroglicinol (PL). Como substância a ser comparada com as substâncias C a E da invenção, foi usado o
10 polímero de polifenol de semente de uva (GP). Os resultados da medição são apresentados nas figuras 7 a 9, junto com os dados das substâncias comparadas.

 Na epicatequina, foi reconhecida a atividade do DPPH de 48,7%, enquanto no resveratrol a atividade foi somente de 23,1%. Na substância A
15 da invenção, onde a epicatequina e o resveratrol foram combinados entre si, a atividade foi alta, ou seja, de 76,1%, o que foi considerado como de significativa excelência (Figura 7).

 Na epicatequina, foi observada a atividade do DPPH de 43,0%, enquanto no floroglicinol, pouca de tal atividade foi observada. Na substância
20 B da invenção, onde o floroglicinol foi combinado com a epicatequina, foi mostrada uma atividade de purificação altamente significativa, se comparada com a de ambas as substâncias (Figura 8).

 Além disso, a substância C da invenção (41,3%) e a substância D da invenção (35,1%) mostraram atividades de purificação superiores em
25 relação às substâncias comparadas (26,9%). A atividade de purificação da substância E da invenção (26,8%) se mostrou como equivalente à atividade da substância comparada (Figura 9).

Método de TEAC (Capacidade Antioxidante Equivalente de Trolox)

 Este método consiste em um método para avaliar relativamente
30 a intensidade antioxidante, mediante conversão da atividade antioxidante de um composto em atividade antioxidante de Trolox, que é um derivado de α -tocoferol, sendo um método amplamente utilizado como índice de atividade



antioxidante.

A 36 μL de uma solução de metmioglobina a 70 μM , foram adicionados 300 μL de uma solução de ABTS e 487 μL de uma solução salina tamponada de fosfato a 5 mM. Em seguida, uma solução de amostra ou solução de Trolox a 1,25 mM foi adicionada e suavemente misturada durante 5 minutos à temperatura de 0°C. Após isso, 167 μL de uma solução de peróxido de hidrogênio a 450 μM foram adicionados e misturados durante 10 segundos e a reação foi deixada prosseguir por 5 minutos à temperatura ambiente. A absorbância foi medida em 734 nm e a proporção entre a amostra e a solução de Trolox foi calculada para servir como valor de TEAC da amostra, contra a solução de Trolox a 1,00 mM.

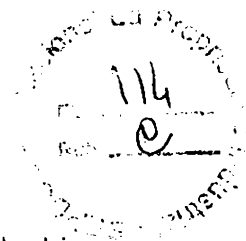
Como no ensaio de DPPH descrito acima, como substância a ser comparada com a substância A da invenção, foram usadas a epicatequina e resveratrol, e como substância a ser comparada com a substância B da invenção, foram usadas epicatequina e floroglicinol. Como substância a ser comparada com as substâncias C a E da invenção, foi usado o polímero de polifenol de semente de uva. Os resultados da medição são mostrados nas figuras 10 a 12, junto com os dados das substâncias comparadas.

Na epicatequina, foi observada a atividade de TEAC de 1,2 mM, enquanto no composto de resveratrol, a atividade foi somente de 1,11 mM. Na substância A da invenção, onde a epicatequina e o resveratrol foram combinados entre si, a atividade foi de 1,33 mM, a qual foi considerada significativamente alta (Figura 10). No floroglicinol, a atividade de TEAC foi bastante baixa, ou seja, de 0,52 mM, enquanto na substância B da invenção, onde a epicatequina foi combinada com o floroglicinol, a atividade foi de 1,44 mM, a qual é significativamente mais alta que a dos dois quando tomadas isoladamente (Figura 11).

A substância C da invenção (1,11), substância D da invenção (1,11) e substância E da invenção (0,97) mostraram altos valores de TEAC, quando comparados com as substâncias comparadas (0,73) (Figura 12).

Exemplo de Teste 2

Como substâncias a serem comparadas com a substância F da



invenção, a qual foi obtida no Exemplo 12, polifenol de semente de lechia (LP) e extrato de chá foram usados para realizar o experimento comparativo.

Teste *in vitro*

Método de Teste: Células NIH3T3 foram semeadas em uma placa de 96 cavidades e cultivadas durante a noite à temperatura de 37°C. No dia seguinte, o meio foi trocado para um meio de cultura isento de soro e a substância a ser testada foi adicionada e uma posterior cultura se realizou durante uma hora. Em seguida, UV foi irradiada durante 20 minutos. O meio foi trocado para um meio contendo soro e a cultura foi realizada durante a noite à temperatura de 37°C. A viabilidade da célula foi avaliada pelo método de MTT. A célula no meio sem a adição da substância a ser testada foi usada como grupo de controle (C).

Os resultados são mostrados na figura 13. No grupo de controle, a viabilidade da célula contra a irradiação por UV foi de cerca de 20%, enquanto na substância F da invenção, a viabilidade foi a mais alta, o que mostrou que a substância F da invenção reduziu de modo significativo o número de células mortas, quando comparado com a substância comparada, a qual apresentava efeito de proteção contra UV.

Teste *in vivo*

Método de Teste: A camundongos machos da espécie Slc:ddY, de apenas 9 semanas de idade, foram administrados forçosamente pela via oral a substância F da invenção e os compostos de LP e TE, respectivamente, cada qual em uma quantidade de 50 mg/kg de peso corporal, diariamente por 3 semanas. A um grupo de controle de camundongos (C), a mesma quantidade de água foi administrada. Duas horas depois da administração da substância de teste no dia final, a atividade antioxidante do método de TEAC e a quantidade de peróxido de lipídeo no soro foram medidas através da coleta do sangue do coração, sob anestesia com éter. A medição do método de TEAC foi conduzida da maneira descrita acima. A quantidade de peróxido de lipídeo foi medida através do uso de um kit comercialmente disponível (peróxido de lipídeo – Teste Wako, fabricado pela Wako Pure Chemical Industries Ltd.) e medição da fluorescência em comprimento de onda de excitação de



515 nm e comprimento de onda fluorescente de 533 nm, na reação entre a precipitação do peróxido de lipídeo e o reagente de ácido 2-tiobarbitúrico, em uma solução de ácido fosfotungístico, sob condição acídica do ácido sulfúrico.

5 Os resultados são mostrados nas Figuras 14 e 15. A substância F da invenção mostrou uma atividade antioxidante significativamente alta, se comparado com a substância comparada e o grupo de controle. Também, a quantidade de peróxido de lipídeo no soro foi significativamente baixa, se comparado com o caso em que se usa a substância comparada.

10 Teste *in vivo*

Método de Teste:

A camundongos machos da espécie Slc:ddY, de apenas 6 semanas de idade, foram administrados forçosamente pela via oral a substância F da invenção e os compostos de LP e TE, respectivamente, cada qual em uma quantidade de 50 mg/kg de peso corporal, diariamente por 3 semanas. A um grupo de controle de camundongos (C), a mesma quantidade de água foi administrada.

No dia anterior à dissecação, foi administrado pela via intraperitoneal 2-NP (70 mg/kg de peso corporal) e 24 horas depois foi coletado o sangue do coração sob anestesia com éter, de modo a medir GOT e GPT no soro. Posteriormente, o fígado foi isolado, de modo a medir a quantidade de peróxido de lipídeo no órgão.

Os resultados são mostrados nas Figuras 16 e 17. Devido à administração do 2-NP, o distúrbio foi causado ao fígado, o que resultou no aumento das concentrações de GOT e GPT. No entanto, a substância F da Invenção reduziu de forma significativa esses aumentos, se comparado ao grupo de controle e à substância comparada. Além disso, a quantidade de peróxido de lipídeo no fígado foi significativamente baixa, se comparado com o caso do uso da substância comparada.

30 Breve Descrição dos Desenhos

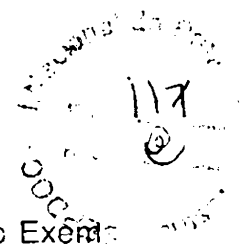
A figura 1A representa um cromatograma do ensaio de HPLC feito para o Exemplo 3, que consistiu no tratamento de casca de cipreste

Japonês e folhas de chá verde com calor, sob uma condição acídica. As Figuras 1B e 1C representam cromatogramas do ensaio de HPLC feitos para o Exemplo 3, que consistiu no tratamento isolado, respectivamente, de casca de cipreste Japonês (Fig. 1B) e folhas de chá verde (Fig. 1C) com calor, sob uma condição acídica.

A figura 2 representa uma fotografia do ensaio de TLC, mostrando que novos compostos de proantocianidina que não estavam presentes na matéria-prima da casca de cipreste Japonês e folhas de chá verde foram gerados pelo tratamento térmico dos materiais, conforme observado no Exemplo 4. Na figura, A é o resultado de como se comporta a camada de acetato de etila adsorvida de chá verde após o tratamento, B é o resultado de como se comporta a camada de acetato de etila adsorvida de casca de cipreste Japonês após o tratamento e C é o resultado de como se comporta a camada de acetato de etila adsorvida da mistura de casca de cipreste Japonês e chá verde após o tratamento. O ponto M é derivado do monômero de proantocianidina não-galoilado, MG é derivado do monômero de proantocianidina galoilado, D é derivado principalmente do dímero de proantocianidina galoilado e T é derivado principalmente do trímero de proantocianidina galoilado.

A figura 3 representa uma fotografia do ensaio de TLC, mostrando que novos compostos de proantocianidina que não estavam presentes na matéria-prima do extrato de casca de banana e folhas de chá verde foram gerados pelo tratamento térmico dos materiais, conforme observado no Exemplo 6. Na figura, A é o resultado de como se comporta individualmente a camada de acetato de etila adsorvida de chá verde após o tratamento, B é o resultado de como se comporta individualmente a camada de acetato de etila adsorvida do extrato de casca de banana após o tratamento e C é o resultado de como se comporta a camada de acetato de etila adsorvida da mistura do extrato de casca de banana e chá verde após o tratamento.

A figura 4 representa uma fotografia do ensaio de TLC, mostrando que novos compostos de proantocianidina que não estavam presentes na matéria-prima do fruto verde de caqui e folhas de chá verde foram ge-



5 rados pelo tratamento térmico dos materiais, conforme observado no Exemplo 5. Na figura, A é o resultado de como se comporta individualmente a camada de acetato de etila adsorvida de chá verde após o tratamento, B é o resultado de como se comporta individualmente a camada de acetato de etila adsorvida do fruto verde de caqui após o tratamento, C é o resultado de como se comporta a camada de acetato de etila adsorvida da mistura do fruto verde de caqui e chá verde após o tratamento e D é o resultado do produto obtido ao permitir que a solução resultante (extrato líquido) obtida pelo tratamento do fruto verde de caqui e folhas de chá verde passe
10 através de uma coluna Sepabeads 825, com eluição da porção adsorvida com água-etanol. Os pontos M, MG, D e T são os mesmos da figura 2.

A figura 5A é o resultado da análise de HPLC de fase normal no produto obtido, após deixar a solução resultante (extrato líquido) obtida pelo tratamento do fruto verde de caqui e folhas de chá verde, passar através de uma coluna Sepabeads 825, com eluição da porção adsorvida com
15 água-etanol, conforme o Exemplo 5. A figura 5B é o resultado da análise de HPLC de fase normal do composto de proantocianidina do cipreste Japonês, usado como exemplo comparativo.

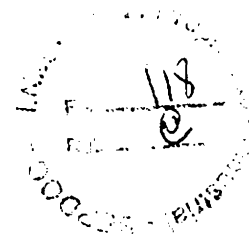
A figura 6 mostra o resultado da análise de TLC nas frações
20 (fração 1 a fração 8) obtidas mediante tratamento do fruto verde de caqui e folhas de chá verde com calor, sob condições acídicas, deixando, depois, as catequinas e proantocianidinas obtidas, passarem através de uma coluna de cromatografia Sephadex LH-20 e sobre uma mistura E, antes da separação que ocorre conforme descrito no Exemplo 6.

25 A figura 7 mostra a atividade de purificação do radical DPPH da substância A da invenção, obtida no Exemplo 7.

A figura 8 mostra a atividade de purificação do radical DPPH da substância B da invenção, obtida no Exemplo 8.

A figura 9 mostra a atividade de purificação do radical DPPH das
30 substâncias C e E da invenção, obtidas nos Exemplos 9-11.

A figura 10 mostra os resultados da avaliação obtidos pelo método TEAC, quanto à capacidade antioxidante da substância A da invenção,



obtida no Exemplo 7

A figura 11 mostra os resultados da avaliação obtidos pelo método TEAC, quanto à capacidade antioxidante da substância B da invenção, obtida no Exemplo 8.

5 A figura 12 mostra os resultados da avaliação obtidos pelo método TEAC, quanto à capacidade antioxidante das substâncias C a E da invenção, obtidas nos Exemplos 9-11.

A figura 13 mostra os resultados do teste relativo ao efeito de proteção de UV na substância F da invenção, obtida no Exemplo 12.

10 A figura 14 mostra os resultados da avaliação obtidos pelo método TEAC, quanto à capacidade antioxidante da substância F da invenção, obtida no Exemplo 12.

A figura 15 mostra os resultados da aferição do nível de LPO no soro, no teste da capacidade antioxidante realizado na substância F da invenção, obtida no Exemplo 12.

15 A figura 16 mostra os resultados da aferição dos níveis de GOT e GPT no soro, no teste da capacidade antioxidante realizado na substância F da invenção, obtidos no Exemplo 12.

20 A figura 17 mostra os resultados da aferição do nível de LPO no fígado, no teste da capacidade antioxidante realizado na substância F da invenção, obtidos no Exemplo 12.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produção de composição contendo, como seu principal componente, um oligômero de proantocianidina apresentando um grau de polimerização de 2 a 4, sendo que catequina ou galato de epigallocatequina são compostos terminais,
- 5 o dito método sendo caracterizado pelo fato de que compreende:
uma etapa de aquecimento de matérias de planta contendo um polímero de proantocianidina ou extrato das mesmas com chá verde, ou extrato das mesmas ou galato de epigallocatequina, plantas contendo tal substância ou extrato das mesmas em uma solução de ácido aquoso pelo uso de
- 10 ácido orgânico selecionado a partir de ácido acético, ácido cítrico, ácido ascórbico e ácido málico, em uma concentração de 0,1 a 1,0 N, e
uma etapa de concentração da solução reacional contendo um oligômero de proantocianidina, apresentando um grau de polimerização de 2
- 15 a 4 e tendo catequina ou galato de epigallocatequina ligado aos terminais, e secagem da solução ou submissão da solução concentrada a um tratamento por fracionamento.
2. Método, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a planta contendo o polímero de proantocianidina é, pelo menos,
- 20 um tipo de planta selecionado do grupo que consiste em videira, pinheiro, Chamaecyparis obtusa, árvore da cânfora, árvore da cera, cacaueiro, tamareira, bananeira, marmeleiro Chinês, macieira, espinheiro, lechia, Myrica rubra e Cinnamomi cortex.
3. Método, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a condição acídica é preparada mediante o uso de ácido orgânico.
- 25
4. Método, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que pelo menos um tipo de ácido é selecionado do grupo que consiste em ácido clorídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido acético, ácido cítrico,
- 30 ácido ascórbico e ácido málico é usado como ácido.

Fig 1

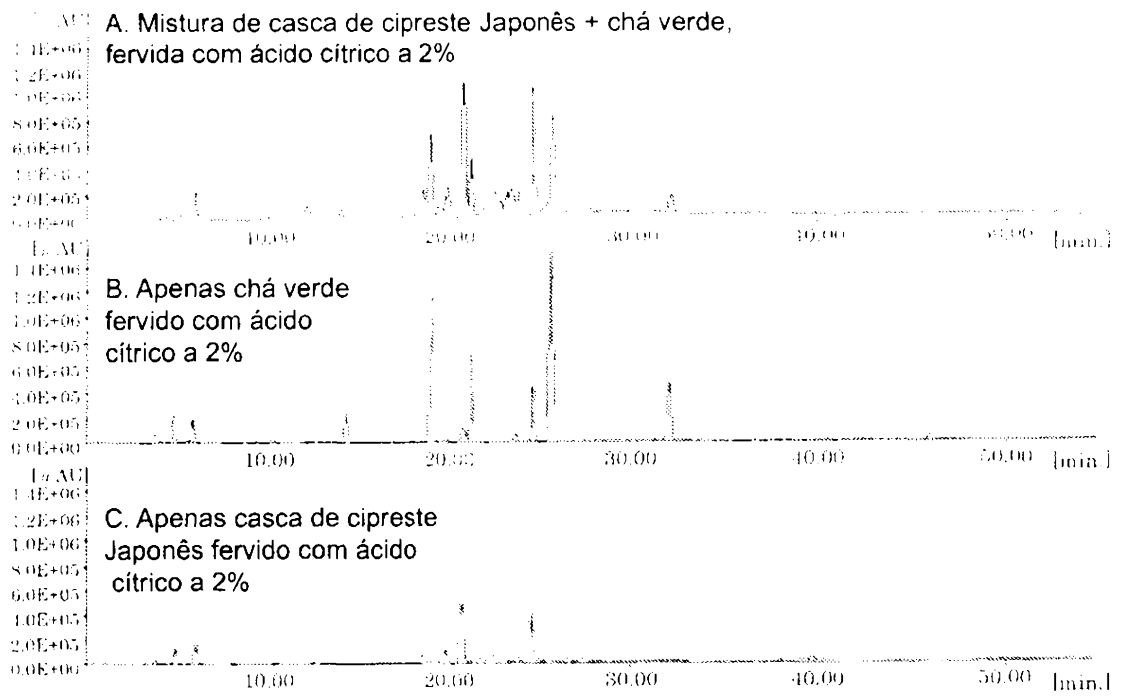


Fig 2



2/9

Fig 3



Fig 4

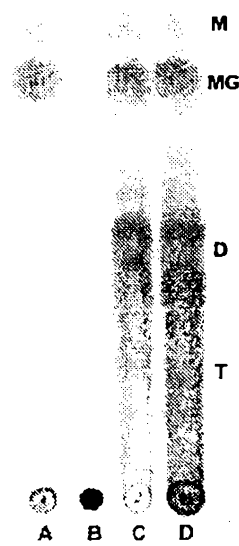


Fig 5

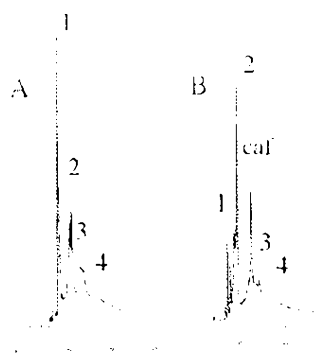


Fig 6

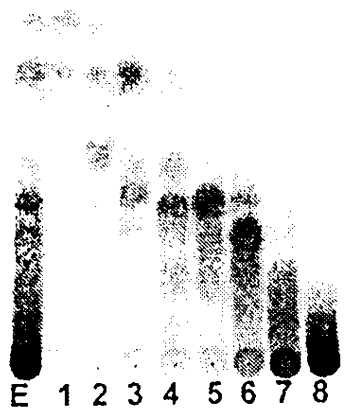


Fig 7

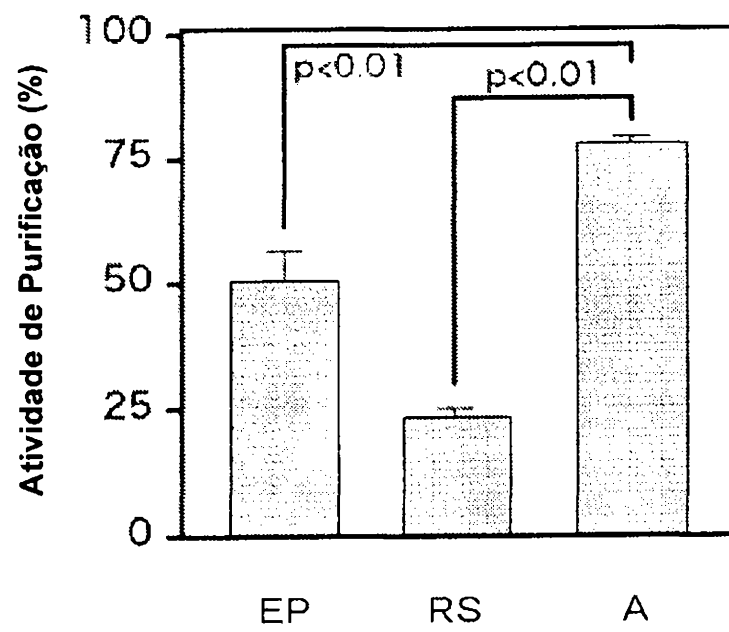


Fig 8

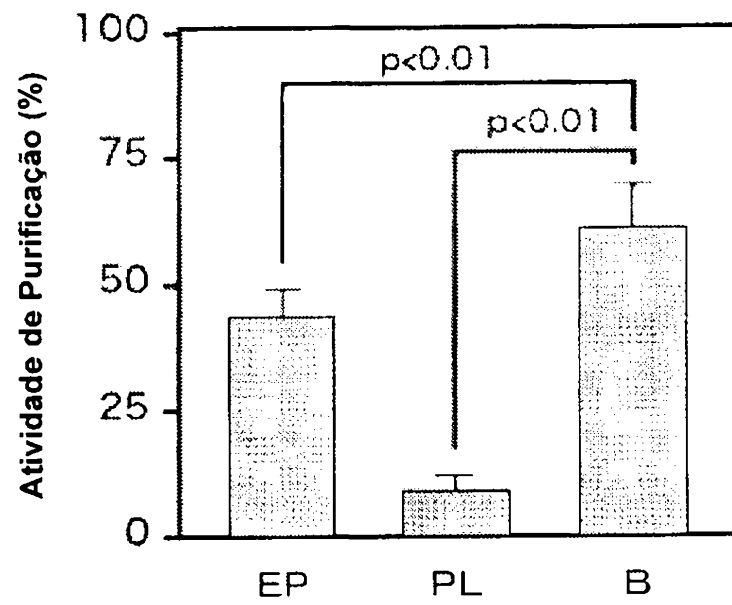


Fig 9

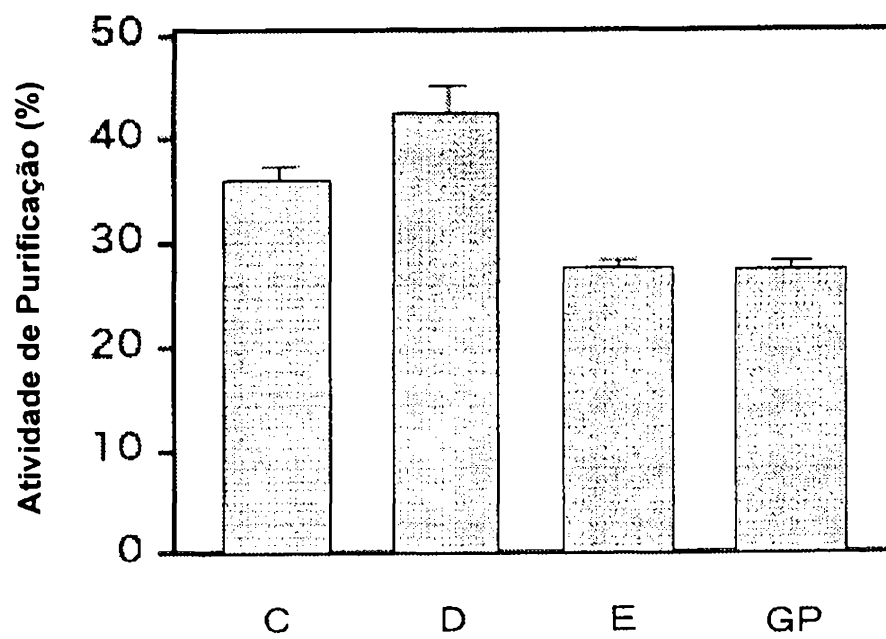


Fig 10

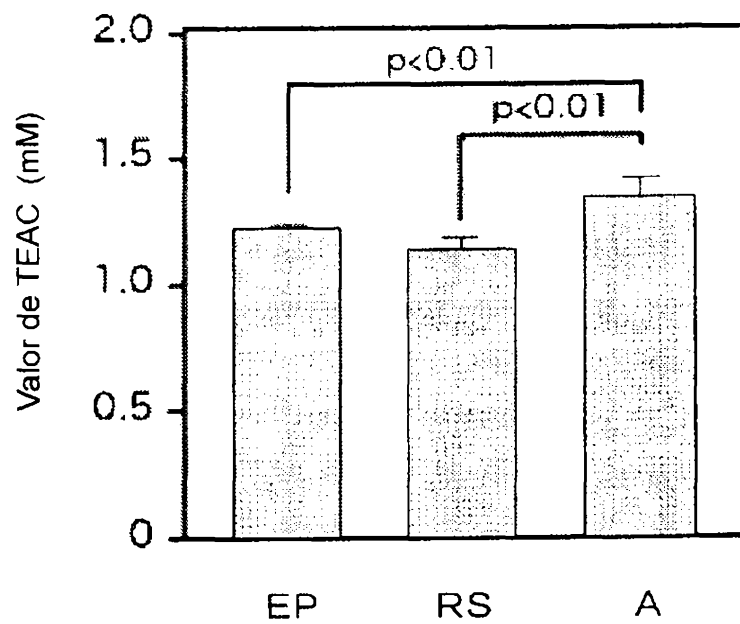


Fig 11

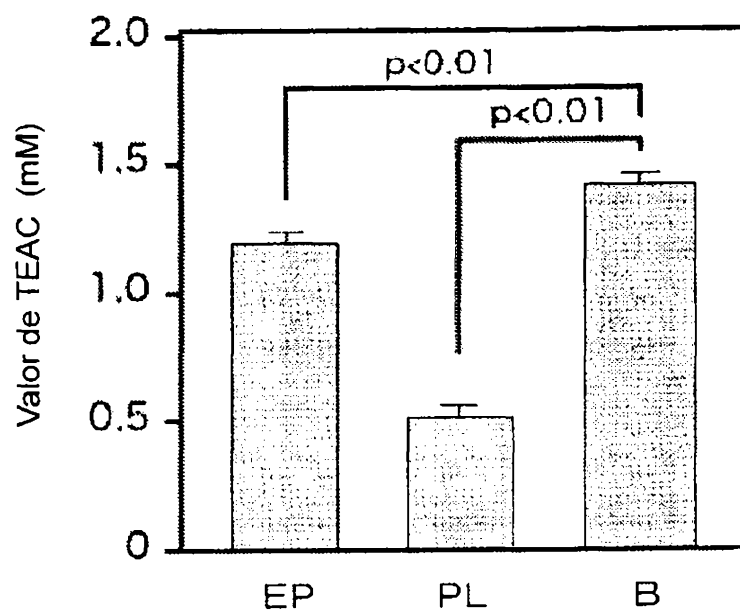


Fig 12

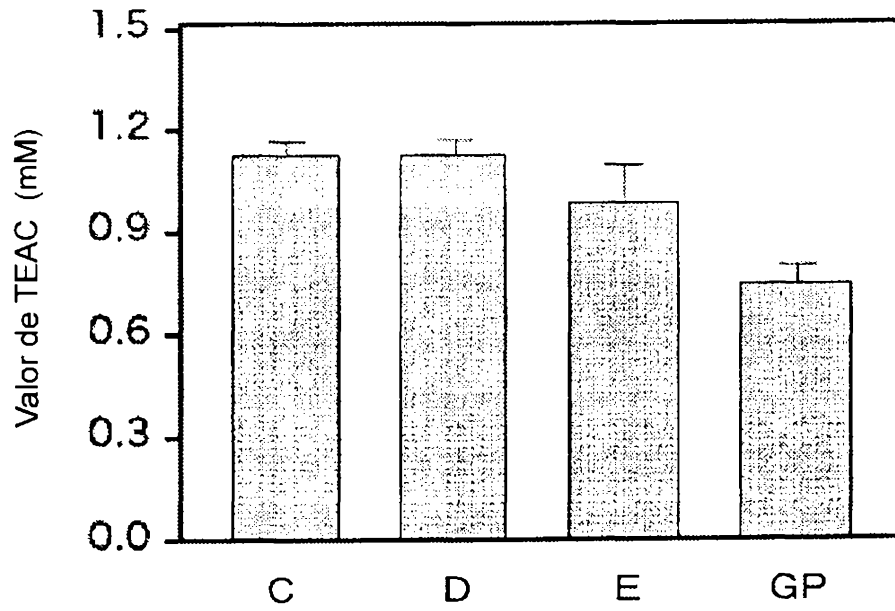


Fig 13

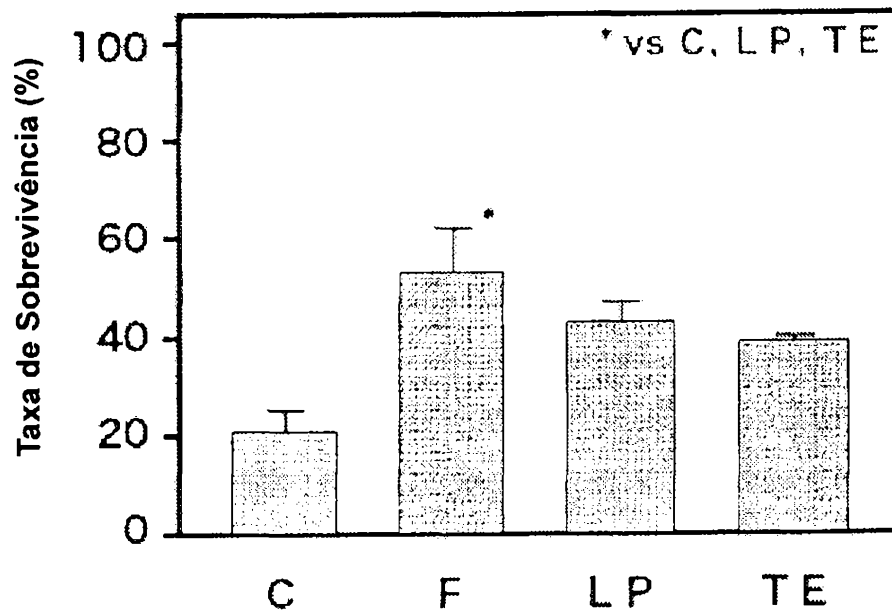


Fig 14

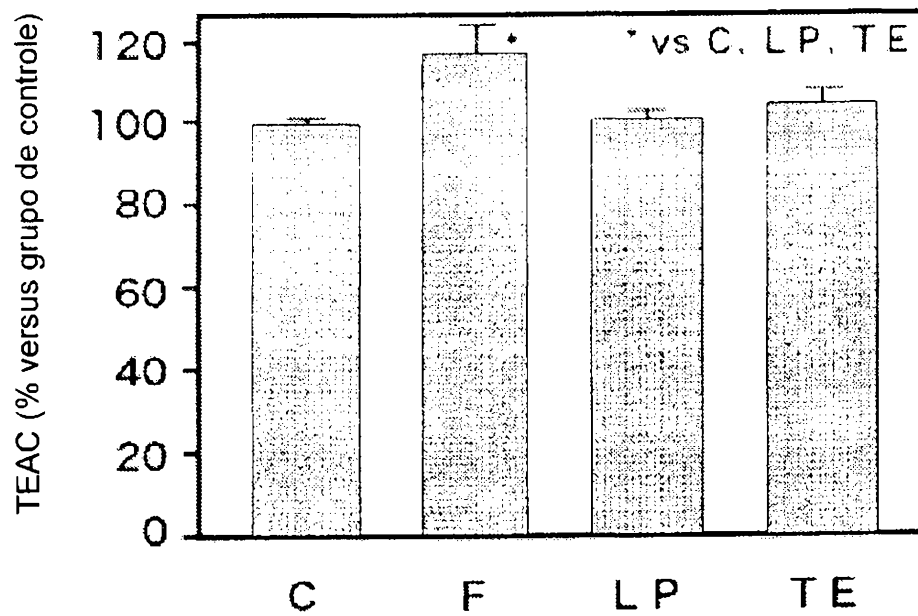


Fig 15

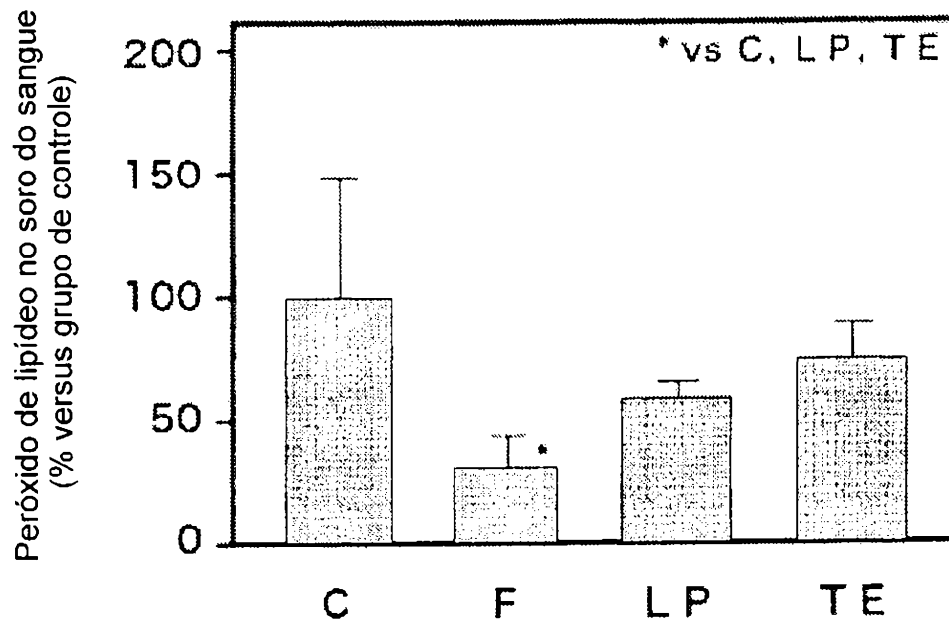


Fig 16

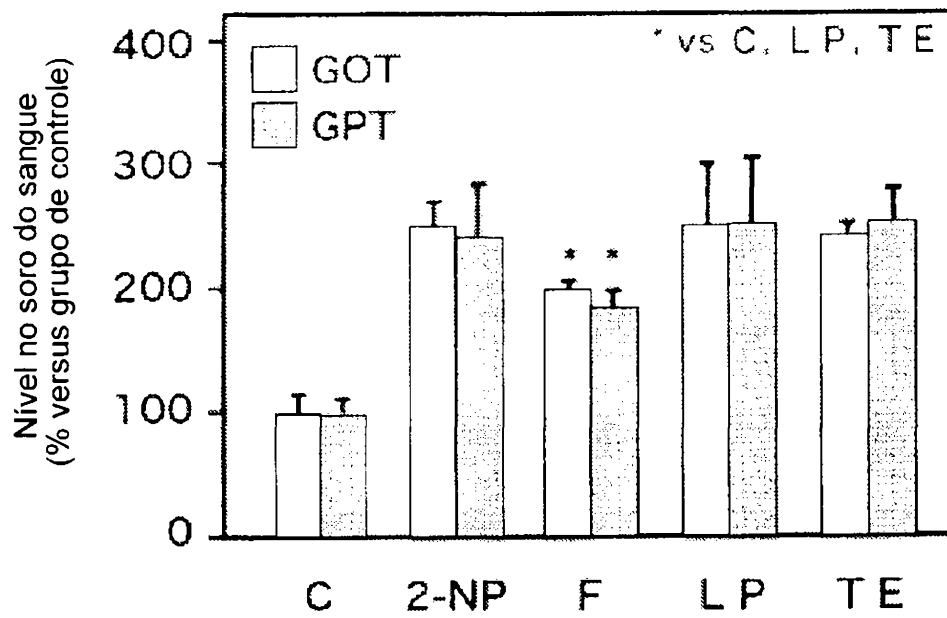


Fig 17

