



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

(21) BR 112020001069-3 A2



(22) Data do Depósito: 31/01/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 19/05/2020

(54) **Título:** MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE CLATRATO DE FLAVONOIDE

(51) **Int. Cl.:** C12P 19/14; A23L 2/00; A23L 2/70; A23L 29/30; A61K 8/33; (...).

(30) **Prioridade Unionista:** 28/07/2017 JP 2017-147121.

(71) **Depositante(es):** TAIYO KAGAKU CO., LTD..

(72) **Inventor(es):** MASAMITSU MORIWAKI; KENTARO KUMOI; MAKOTO OZEKI.

(86) **Pedido PCT:** PCT JP2018003177 de 31/01/2018

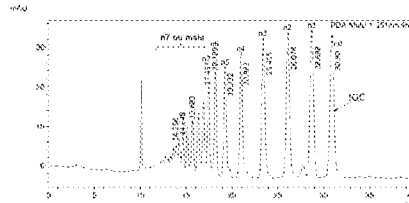
(87) **Publicação PCT:** WO 2019/021510 de 31/01/2019

(85) **Data da Fase Nacional:** 17/01/2020

(57) **Resumo:** A presente invenção refere-se a um método para produzir um composto de inclusão de flavonoide que inclui uma etapa de clivagem que inclui tratamento de um flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo com uma enzima que tem uma atividade de ramnosidase na presença de uma ciclodextrina para clivar a ramnose. De acordo com o método de produção da presente invenção, um composto de inclusão de flavonoide e uma composição de glicosídeos de flavonoides que tem excelente solubilidade em água podem ser produzidos com eficiência, de modo que o composto e a composição possam ser adequadamente usados nos campos de medicamentos, alimentos, alimentos saudáveis, alimentos para uso específico na saúde, cosméticos e assim por diante.

FIG. 1 <Cromatograma por HPLC do Exemplo 39>

<Cromatograma>



n0 a n7 é um valor de n na fórmula geral (1) e n0 é IQC

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE CLATRATO DE FLAVONOIDE".

### CAMPO TÉCNICO

[0001] A presente invenção refere-se a um método para a produção de um composto de inclusão de flavonoide, um método para a produção de uma composição de glicosídeos de flavonoides, um composto de inclusão de flavonoide, uma composição que contém um composto de inclusão de flavonoide, uma composição de glicosídeos de isoquercitrina, uma composição de glicosídeos de hesperetina-7-glicosídeo, uma composição de glicosídeos de naringenina-7-glicosídeo, um gênero alimentício, um medicamento ou um cosmético que contém estes compostos ou composições e um método para melhorar a solubilidade de um flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo.

### ANTECEDENTES DA TÉCNICA

[0002] Uma vez que os flavonoides têm um efeito antioxidante, os flavonoides têm sido usados na prevenção de deterioração do sabor dos alimentos, na prevenção de desvanecimento da cor e assim por diante e, em listas de aditivos alimentícios, aditivos e antioxidantes já existentes no Japão, foram relatadas numerosas substâncias que contêm flavonoides como ingrediente ativo, tais como catequinas, rutinas enzimaticamente modificadas, extratos de rutina, extratos de chá, extratos de baunilha chinesa. Além disso, foram relatadas ações fisiológicas, antitumorais, de redução de colesterol, diminuição da pressão sanguínea, redução de açúcar no sangue, redução de gorduras corporais e assim por diante dos flavonoides, e os flavonoides têm sido amplamente usados em medicamentos, gêneros alimentícios e produtos naturais, alimentos para uso específico na saúde, cosméticos e assim por diante.

[0003] Os flavonoides estão contidos em vegetais, frutas, chás e

assim por diante, e são conhecidos 3.000 ou mais tipos de flavonoides, porém, muitos deles são pouco solúveis em água, de modo que é difícil usar flavonoides em gêneros alimentícios, bebidas, medicamentos ou cosméticos que requereriam capacidade prontamente solúvel em água, tal como em bebidas refrescantes, agentes aquosos e assim por diante. Por exemplo, a solubilidade da hesperidina ou rutina, a qual é um flavonoide representativo, é de 0,01% ou menos, de modo que é difícil usá-la para bebidas refrescantes, loções cosméticas ou similar.

[0004] Os flavonoides pouco solúveis podem ser classificados como aqueles que têm uma estrutura de ramnosídeo e sem estrutura de ramnosídeo, e foi relatado que a isoquercitrina, hesperetina-7-glucosídeo, naringenina ou naringenina-7-glucosídeo, nos quais a ramnose é clivada, tem maior biodisponibilidade em ratos do que a rutina, hesperidina ou naringina que tem uma estrutura de ramnosídeo (Publicações Não Patente 1 a 3).

[0005] Além disso, sabe-se que a biodisponibilidade é aprimorada e os efeitos fisiológicos são efetivamente mostrados pela inclusão de um flavonoide pouco solúvel com uma ciclodextrina ou ao submeter um flavonoide pouco solúvel à glicosidação. Quanto a um composto de inclusão, por exemplo, foi relatado que um composto de inclusão de isoquercitrina (1M)- $\gamma$ -ciclodextrina (5 M) tem uma taxa de absorção corporal mais elevada do que a isoquercitrina (Publicação de Patente 1), que, em um experimento com camundongos, um composto de inclusão de hesperetina- $\beta$ -ciclodextrina ou similar tem maior biodisponibilidade (AUC: 0 a 9 horas) e efeitos mais elevados de ações de supressão de reações alérgicas, ações de melhora do fluxo sanguíneo e sensibilidade a ações de melhora do frio do que a hesperetina (Publicação de Patente 2) e que um composto de inclusão de naringenina-hidroxipropil  $\beta$ -ciclodextrina tem uma biodisponibilidade elevada (rato), uma redução de VLDL (lipoproteína de densidade muito baixa) e uma

taxa aumentada de depuração da glucose comparado com a naringenina (Publicação Não Patente 4). Quanto à glicosidação, por exemplo, foi relatado que os efeitos antialérgicos em camundongos são da ordem de "rutina enzimaticamente modificada < isoquercitrina < isoquercitrina enzimaticamente modificada" e uma isoquercitrina enzimaticamente modificada na qual uma ramnose é removida e é solúvel em água mostra os maiores efeitos (Publicação Não Patente 5).

[0006] Além das publicações acima, um método para clivar uma ramnose de um flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo foi descrito, por exemplo, nas Publicações de Patente 3 a 6. Um método para incluir um flavonoide pouco solúvel com uma ciclodextrina foi descrito, por exemplo, nas Publicações de Patente 2, 7 e 8. Um método para submeter um flavonoide pouco solúvel à glicosidação foi descrito, por exemplo, nas Publicações de Patente 9 e 10. Além disso, a Publicação de Patente 11 descreve um método para solubilização que inclui permitir que um flavonoide pouco solúvel esteja copresente com uma saponina de soja e/ou uma composição de glicosídeos de malonil isoflavona como um método para produzir um flavonoide pouco solúvel prontamente solúvel em água.

[0007] Além disso, foi descrito um método para melhorar a solubilidade em água caracterizado pela combinação de um flavonoide pouco solúvel com glicosídeos de flavonoide prontamente solúveis em água como um método para melhorar a solubilidade de um flavonoide pouco solúvel (Publicações de Patente 3 a 4 e 12) e um flavonoide solúvel em água caracterizado pelo fato de que o flavonoide contém um flavonoide- $\beta$ -ciclodextrina pouco solúvel e uma glicosil hesperidina (Publicação de Patente 8).

## **REFERÊNCIAS DO ESTADO DA TÉCNICA**

### **PUBLICAÇÕES DE PATENTES**

[0008] Publicação de Patente 1: Patente Japonesa N° 5002072

- [0009] Publicação de Patente 2: Patente Japonesa N° 5000884
- [0010] Publicação de Patente 3: Patente Japonesa N° 4902151
- [0011] Publicação de Patente 4: Patente Japonesa N° 3833775
- [0012] Publicação de Patente 5: Patente japonesa N° 4498277
- [0013] Publicação de Patente 6: patente japonesa N° 5985229
- [0014] Publicação de Patente 7: Patente japonesa N° 3135912
- [0015] Publicação de Patente 8: Patente Japonesa N° 5000373
- [0016] Publicação de Patente 9: Patente japonesa N° 4202439
- [0017] Publicação de Patente 10: Patente japonesa N° 3989561
- [0018] Publicação de Patente 11: Patente japonesa concedida N° 2011-225586
- [0019] Publicação de Patente 12: Patente Japonesa N° Hei-07-10898

#### **PUBLICAÇÕES NÃO PATENTES**

- [0020] Publicação Não Patente 1: *British Journal of Nutrition*, **102**, 976-984, 2009
- [0021] Publicação Não Patente 2: *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **32** (12), 2034-2040, 2009
- [0022] Publicação Não Patente 3: *American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology*, **279**, 1148-1154, 2000
- [0023] Publicação Não Patente 4: *PLOS ONE* (4), e18033, 2011
- [0024] Publicação Não Patente 5: *Journal of natural Medicines*, Oct, **67** (4), 881-6, 2013

#### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

##### **PROBLEMAS A SEREM RESOLVIDOS PELA INVENÇÃO**

[0025] No entanto, não é dito que os métodos de produção descritos nas publicações anteriores do estado da técnica têm uma excelente eficiência de produção, e os flavonoides obtidos não satisfazem suficientemente uma solubilidade em água, de modo que melhorias adicionais são desejadas.

[0026] Um objetivo da presente invenção é fornecer um método fácil e eficiente para a produção de um composto de inclusão de flavonoide e uma composição de glicosídeos de flavonoides que tem uma excelente solubilidade em água. Além disso, um objetivo é fornecer um composto de inclusão de flavonoide que tem uma excelente solubilidade em água, uma composição que contém compostos de inclusão de flavonoides, uma composição de glicosídeos de isoquercitrina, uma composição de glicosídeos de hesperetina-7-glicosídeo, uma composição de glicosídeos de naringenina-7-glucosídeo, um gênero alimentício, medicamento ou cosmético que contém estes compostos ou composições e um método para melhorar a solubilidade de um flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo.

#### **MEIOS PARA RESOLVER OS PROBLEMAS**

[0027] A presente invenção se refere a:

[0028] [1] um método para produzir um composto de inclusão de flavonoide que inclui uma etapa de clivagem que inclui tratamento de um flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo com uma enzima que tem uma atividade de ramnosidase na presença de uma ciclodextrina para clivar uma ramnose;

[0029] [2] um método para produzir uma composição de glicosídeos de flavonoides que inclui uma etapa de glicosidação que inclui o tratamento de um composto de inclusão de flavonoide obtido de acordo com um método definido em [1] acima com uma glicosil transferase para submeter o composto de inclusão de flavonoide à glicosidação;

[0030] [3] um método para a produção de uma composição de glicosídeos de flavonoides que inclui uma etapa de clivagem que inclui tratamento de um flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo com uma enzima que tem atividade de ramnosidase na presença de uma ciclodextrina para clivar uma ramnose e uma etapa de glicosidação que inclui tratamento de um composto de inclusão de

flavonoide obtido por meio da etapa de clivagem com uma glicosil transferase para submeter o composto de inclusão de flavonoide à glicosidação;

[0031] [4] um composto de inclusão de flavonoide que contém isoquercitrina com inclusão em  $\gamma$ -ciclodextrina, em que a proporção molar de isoquercitrina e  $\gamma$ -ciclodextrina ( $\gamma$ -ciclodextrina/isoquercitrina) é a partir de 0,9 a 1,8 e em que uma solubilidade em água da isoquercitrina é 2% ou mais;

[0032] [5] um composto de inclusão de flavonoide que contém isoquercitrina com inclusão em  $\gamma$ -ciclodextrina, em que a proporção molar de isoquercitrina e  $\gamma$ -ciclodextrina ( $\gamma$ -ciclodextrina/isoquercitrina) é a partir de 0,9 a 4,0 e em que uma solubilidade em água da isoquercitrina é 2,5% ou mais;

[0033] [6] um composto de inclusão de flavonoide que contém isoquercitrina com inclusão em  $\beta$ -ciclodextrina, em que a proporção molar de isoquercitrina e  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -ciclodextrina/isoquercitrina) é a partir de 1,0 a 3,0 e em que uma solubilidade em água da isoquercitrina é 0,1% ou mais;

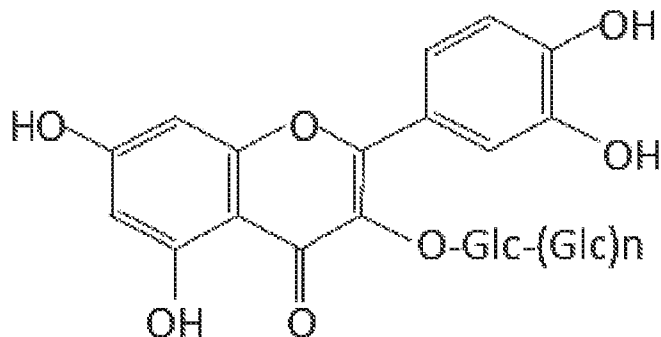
[0034] [7] um composto de inclusão de flavonoide que contém hesperetina-7-glucosídeo com inclusão em uma ciclodextrina, em que a proporção molar de hesperetina-7-glucosídeo e ciclodextrina (ciclodextrina/hesperetina-7-glucosídeo) é a partir de 1,0 a 3,0 e em que a solubilidade em água da hesperetina-7-glucosídeo em água é 0,01% ou mais;

[0035] [8] um composto de inclusão de flavonoide que contém naringenina-7-glucosídeo com inclusão em  $\beta$ -ciclodextrina, em que a proporção molar de naringenina-7-glucosídeo e  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -ciclodextrina/naringenina-7-glucosídeo) é a partir de 1,0 a 3,0 e em que uma solubilidade em água da naringenina-7-glucosídeo é 0,01% ou mais;

[0036] [9] uma composição que contém um composto de inclusão de flavonoide que contém um composto de inclusão de flavonoide, conforme definido em qualquer um de [4] a [8] acima, e uma ramnose, em que a proporção molar do composto de inclusão de flavonoide e da ramnose (ramnose/flavonoide) é a partir de 0,8 a 1,2;

[0037] [10] uma composição que contém um composto de inclusão de flavonoide que contém um composto de inclusão de flavonoide, conforme definido em qualquer um de [4] a [8] acima, e um flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo, em que a proporção molar de um flavonoide no composto de inclusão de flavonoide e do flavonoide pouco solúvel (flavonoide/flavonoide pouco solúvel no composto de inclusão) é a partir de 0,001 a 0,1;

[0038] [11] uma composição de glicosídeos de isoquercitrina que contém um composto representado pela fórmula geral (1) a seguir:



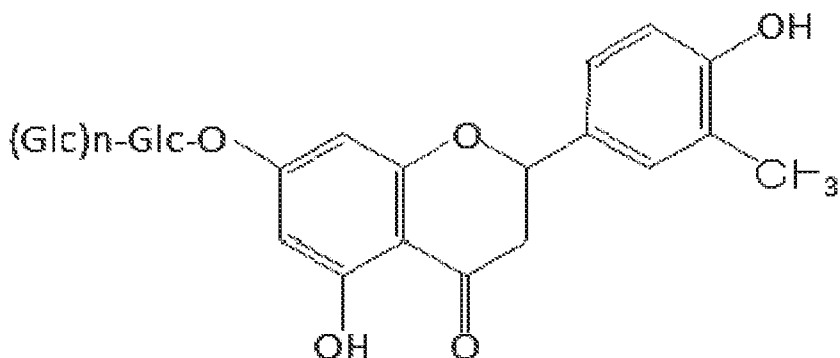
(1)

em que, na fórmula geral (1), Glc significa um resíduo de glucose e n significa um número inteiro de 0 ou 1 ou mais, e

[0039] em que o teor de glicosídeos que tem  $n = 0$  é 10% em mol ou mais e 30% em mol ou menos, o teor de glicosídeos que tem  $n = 1$  a 3 é 50% em mol ou menos e o teor de glicosídeos que tem  $n = 4$  ou mais é 30% em mol ou mais, da composição de glicosídeos;

[0040] [12] uma composição de glicosídeos de hesperetina-7-glicosídeo que contém um composto representado pela fórmula geral (2) a seguir:



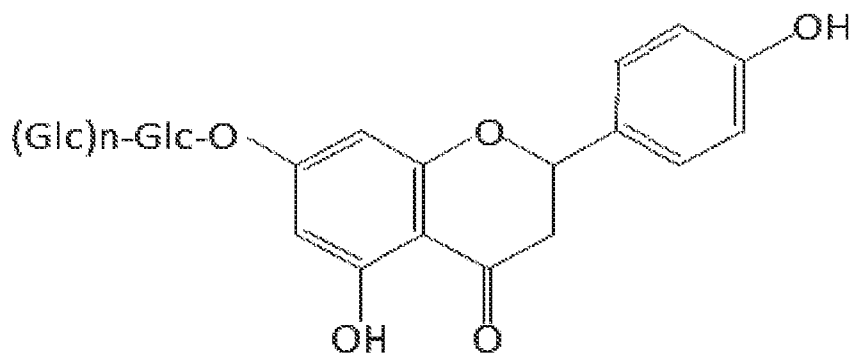


(2)

em que, na fórmula geral (2), Glc significa um resíduo de glucose e n significa um número inteiro de 0 ou 1 ou mais, e

[0041] em que o teor de glicosídeos que tem n = 0 é 10% em mol ou mais e 30% em mol ou menos, o teor de glicosídeos que tem n = 1 a 3 é 50% em mol ou menos e o teor de glicosídeos que tem n = 4 ou mais é 30% em mol ou mais, da composição de glicosídeos;

[0042] [13] uma composição de glicosídeos de naringenina-7-glicosídeo que contém um composto representado pela fórmula geral (3) a seguir:



(3)

em que, na fórmula geral (3), Glc significa um resíduo de glucose e n significa um número inteiro de 0 ou 1 ou mais, e

[0043] em que o teor de glicosídeos que tem n = 0 é 10% em mol ou mais e 30% em mol ou menos, o teor de glicosídeos que tem n = 1 a 3 é 50% em mol ou menos e o teor de glicosídeos que tem n = 4 ou mais é 30% em mol ou mais, da composição de glicosídeos;

[0044] [14] um gênero alimentício que contém um ou mais com-

postos ou composições selecionados a partir do grupo que consiste em um composto de inclusão de flavonoide obtido de acordo com um método conforme definido em [1] acima, uma composição de glicosídeos de flavonoides obtida de acordo com um método conforme definido em [2] ou [3] acima, um composto de inclusão de flavonoide conforme definido em qualquer um de [4] a [8] acima, uma composição que contém um composto de inclusão de flavonoide conforme definido em [9] ou [10] acima, uma composição de glicosídeos de isoquercitrina conforme definido em [11] acima, uma composição de glicosídeos de hesperetina-7-glucosídeo conforme definido em [12] acima e uma composição de glicosídeos de naringenina-7-glucosídeo conforme definido em [13] acima;

[0045] [15] um medicamento que contém um ou mais compostos ou composições selecionados a partir do grupo que consiste em um composto de inclusão de flavonoide obtido de acordo com um método conforme definido em [1] acima, uma composição de glicosídeos de flavonoides obtida de acordo com um método conforme definido em [2] ou [3] acima, um composto de inclusão de flavonoide conforme definido em qualquer um de [4] a [8] acima, uma composição que contém um composto de inclusão de flavonoide conforme definido em [9] ou [10] acima, uma composição de glicosídeos de isoquercitrina conforme definido em [11] acima, uma composição de glicosídeos de hesperetina-7-glucosídeo conforme definido em [12] acima e uma composição de glicosídeos de naringenina-7-glucosídeo conforme definido em [13] acima;

[0046] [16] um cosmético que contém um ou mais compostos ou composições selecionados a partir do grupo que consiste em um composto de inclusão de flavonoide obtido de acordo com um método conforme definido em [1] acima, uma composição de glicosídeos de flavonoides obtida de acordo com um método conforme definido em [2]

ou [3] acima, um composto de inclusão de flavonoide conforme definido em qualquer um de [4] a [8] acima, uma composição que contém um composto de inclusão de flavonoide conforme definido em [9] ou [10] acima, uma composição de glicosídeos de isoquercitrina conforme definido em [11] acima, uma composição de glicosídeos de hesperetina-7-glucosídeo conforme definido em [12] acima e uma composição de glicosídeos de naringenina-7-glucosídeo conforme definido em [13] acima; e

[0047] [17] um método para melhorar a solubilidade de um flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo que incluir misturar o flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo com um composto de inclusão de flavonoide obtido de acordo com um método conforme definido em [1] acima ou um composto de inclusão de flavonoide conforme definido em qualquer um de [4] a [8] acima, em um meio de modo que a proporção molar de um flavonoide no composto de inclusão de flavonoide para o flavonoide pouco solúvel (flavonoide no composto de inclusão/flavonoide pouco solúvel) seja a partir de 0,1 a 0,9.

### **EFEITOS DA INVENÇÃO**

[0048] De acordo com a presente invenção, é fornecido um método fácil e eficiente para produzir um composto de inclusão de flavonoide e uma composição de glicosídeos de flavonoides que tem uma excelente solubilidade em água. Além disso, são fornecidos um composto de inclusão de flavonoide que tem uma excelente solubilidade em água, uma composição que contém compostos de inclusão de flavonoides, uma composição de glicosídeos de isoquercitrina, uma composição de glicosídeos de hesperetina-7-glucosídeo, uma composição de glicosídeos de naringenina-7-glucosídeo, gêneros alimentícios, medicamentos ou cosméticos que contêm estes compostos ou composições e um método para melhorar a solubilidade de um fla-

vonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo.

#### **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

[0049] A Figura 1 mostra um cromatograma de HPLC do Exemplo 39.

[0050] A Figura 2 mostra um cromatograma de HPLC do Exemplo 40.

#### **MODOS PARA REALIZAÇÃO DA INVENÇÃO**

[0051] Como um resultado de estudo dos objetivos acima, os presentes inventores descobriram que um composto de inclusão de flavonoide pode ser produzido ao mesmo tempo que a clivagem de uma ramnose de um flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo na presença de uma ciclodextrina para, assim, clivar a ramnose, de modo que um composto de inclusão de flavonoide possa ser produzido com mais eficiência do que o método convencional no qual a etapa de clivagem e a etapa de inclusão foram realizadas separadamente. Surpreendentemente, os inventores descobriram que o composto de inclusão de flavonoide obtido de acordo com o método de produção tem uma melhor solubilidade em água do que um composto de inclusão de flavonoide produzido de acordo com o método convencional. Na presente invenção, além da ciclodextrina, vários oligossacarídeos cíclicos podem ser usados da mesma maneira. Um oligossacarídeo cíclico, conforme usado aqui, se refere a um composto no qual os monossacarídeos estão ligados de uma forma cíclica e, mais especificamente, exemplos incluem ciclodextrina, ciclodextrana, ciclofrutana, cicloalternana, dextrina agrupada e assim por diante. Na descrição a seguir, uma modalidade que usa ciclodextrina será explicada como um exemplo; no entanto, a presente invenção não se destina a estar limitada a ela e outros oligossacarídeos cíclicos podem ser usados da mesma maneira.

[0052] O método para produzir um composto de inclusão de fla-

vonóide da presente invenção inclui uma etapa de clivagem que inclui tratamento de um flavonóide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo com uma enzima que tem uma atividade de ramnosidase na presença de uma ciclodextrina para clivar uma ramnose.

[0053] A etapa de clivagem é uma etapa de clivagem de uma ramnose de um flavonóide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo para obter um composto de inclusão de um flavonóide sem uma estrutura de ramnosídeo e uma ciclodextrina (também conhecido como "composto de inclusão de flavonóide"). A etapa de clivagem pode ser realizada enquanto se permite repousar em um meio, tal como água, ou durante agitação, ou o ar no espaço superior de um sistema de reação pode ser substituído por um gás inerte, tal como nitrogênio, para evitar oxidação ou escurecimento durante a reação e também um antioxidante, tal como ácido ascórbico, pode ser adicionado a um sistema de reação. A etapa de clivagem pode ser terminada por meio de um método conhecido, tal como um método que inclui um método de desativação enzimática por meio de aquecimento ou similar.

[0054] O flavonóide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo inclui aqueles selecionados a partir de flavonóis, flavanonas, flavonas e isoflavonas e aqueles que têm uma estrutura na qual um ou mais, de preferência dois ou mais grupos hidroxila, estão ligados a um anel de benzeno de um esqueleto de flavonóide e que contêm uma ramnose, podem ser usados. Aqui, "pouco solúvel" se refere a uma solubilidade em água a 25°C de 1,0% em massa ou menos, de preferência 0,1% ou menos e, mais preferivelmente, 0,01% em massa ou menos. Exemplos específicos incluem rutina, hesperidina, narirutina, naringina, diosmina, eriocitrina, mirricitrina, neoesperidina, luteolina-7-rutinosídeo, delfinidina-3-rutinosídeo, cianidina-3-rutinosídeo, isoramnetina-3-rutinosídeo, caemferferol-7-rutinosídeo, acacetina-7-rutinosídeo, derivados dos mesmos e assim por diante. Os derivados incluem

compostos acetilados, compostos malonilados, compostos metilados e assim por diante.

[0055] A quantidade de flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo usada não está particularmente limitada e a quantidade usada pode ser, de preferência, a partir de 0,1 a 20% em massa, mais preferivelmente a partir de 1 a 15% em massa e, ainda mais preferivelmente, a partir de 2 a 14% em massa no sistema de reação. Quando flavonoides pouco solúveis que têm uma estrutura de ramnosídeo são usados em dois ou mais tipos, a quantidade usada se refere a uma quantidade total dos mesmos.

[0056] As matérias-primas que contêm um flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo usadas no método de produção da presente invenção não precisam ser particularmente purificadas, porém, as matérias-primas são, de preferência, purificadas. O teor do flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo nas matérias-primas acima não está particularmente limitado, e um flavonoide pouco solúvel que tem, de preferência, um teor de 5% ou mais, mais preferivelmente 20% ou mais, ainda mais preferivelmente 50% ou mais, mais preferivelmente 80% ou mais e, ainda mais preferivelmente, 90% ou mais pode ser usado.

[0057] A ciclodextrina (CD) a qual está presente na etapa de clivagem não está particularmente limitada e, mais preferivelmente, um ou mais elementos selecionados a partir do grupo que consiste em  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD),  $\beta$ -ciclodextrina ramificada ( $\beta$ -CD) e  $\gamma$ -ciclodextrina ( $\gamma$ -CD) podem ser usados. A ciclodextrina é um tipo de oligossacarídeo cíclico no qual as D-glucoses estão ligadas por meio de uma ligação  $\alpha$ -1,4-glicosídica para formar uma estrutura cíclica, e aquelas nas quais sete glucoses estão ligadas são  $\beta$ -ciclodextrina e aquelas nas quais oito glucoses estão ligadas são  $\gamma$ -ciclodextrina. A  $\beta$ -CD ramificada é aquela na qual um ou mais resíduos de glucose, grupos galactosila ou

grupos hidroxipropila estão ligados à  $\beta$ -CD como uma cadeia lateral, incluindo maltosil- $\beta$ -CD (G2- $\beta$ -CD), hidroxipropil- $\beta$ -CD (HP- $\beta$ -CD) e assim por diante. Aqui, a frase "na presença de uma ciclodextrina" se refere a um estado onde uma ciclodextrina está contida no sistema de reação de clivagem.

[0058] A quantidade de ciclodextrina presente não está particularmente limitada e a quantidade pode ser, de preferência, a partir de 0,01 a 60% em massa, mais preferivelmente a partir de 1 a 50% em massa e, ainda mais preferivelmente, a partir de 3 a 40% em massa no sistema de reação. Quando a ciclodextrina é usada em dois ou mais tipos, a quantidade se refere a uma quantidade total da mesma.

[0059] A proporção molar da ciclodextrina para o flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo (ciclodextrina/flavonoide) é, de preferência, 0,01 ou mais, mais preferivelmente 0,1 ou mais, ainda mais preferivelmente 0,9 ou mais e, mais preferivelmente, 1,0 ou mais do ponto de vista da eficiência, e a proporção molar é, de preferência, 10,0 ou menos, mais preferivelmente 6,0 ou menos, ainda mais preferivelmente 4,0 ou menos e, mais preferivelmente, 3,0 ou menos do ponto de vista das vantagens econômicas.

[0060] Como a enzima que tem uma atividade de ramnosidase, suas origens não estão limitadas e todas as origens, tais como origem animal, origem vegetal e origem de micro-organismos, podem ser usadas. Além disso, a enzima pode ser uma enzima geneticamente recombinante. Além disso, a forma da enzima não está particularmente limitada.

[0061] Exemplos específicos da enzima que tem uma atividade de ramnosidase incluem hesperiginase, naringinase,  $\beta$ -glucosidase, pectinase e assim por diante.

[0062] A quantidade da enzima que tem uma atividade de ramnosidase usada é variada, dependendo dos tipos de enzimas usadas,

condições de reação, tipos de flavonoides pouco solúveis que têm uma estrutura de ramnosídeo das matérias-primas. Quando a enzima é, por exemplo, hesperiginase, naringinase e  $\beta$ -glucosidase, a quantidade é, de preferência, de 0,01 a 1.000 U com base em 1 g dos flavonoides pouco solúveis que têm uma estrutura de ramnosídeo. Quanto às condições de reação, a temperatura da reação ou o pH da mistura de reação líquida pode ser selecionado dependendo das propriedades da enzima usada, e o pH é, de preferência, a partir de 3 a 7 e o pH é, mais preferivelmente, a partir de 3,5 a 6,5. Além disso, o flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo pode ser dissolvido em uma região alcalina e, em seguida, submetido a uma reação enzimática em um pH de 7 ou menos. O solvente usado no sistema de reação inclui um meio aquoso. Meio aquoso, conforme usado aqui, se refere à água ou a uma solução aquosa de um solvente orgânico. Exemplos de água incluem água da torneira, água destilada, água com permuta de íons e água purificada. O solvente orgânico não está particularmente limitado, contanto que o solvente orgânico seja igualmente miscível com água. O solvente orgânico é, de preferência, etanol do ponto de vista de que o solvente orgânico é aplicável a alimentos. Além disso, a temperatura da reação é, de preferência, a partir de 10°C a 80°C, e mais preferivelmente, a partir de 40°C a 75°C. Além disso, o tempo de reação é variado, dependendo dos tipos de enzimas ou similar, e o tempo de reação pode ser, por exemplo, a partir de 1 a 100 horas e, de preferência, a partir de 2 a 24 horas.

[0063] A enzima que tem uma atividade de ramnosidase pode ter uma atividade de glucosidase e a obtenção de um composto de inclusão de agliconas (um composto de inclusão de quercetina, um composto de inclusão de hesperetina, um composto de inclusão de naringenina, um composto de inclusão de mirricetina ou similar) a partir de um composto de flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de

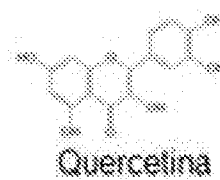
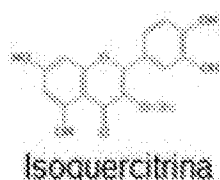
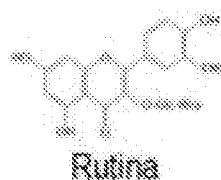


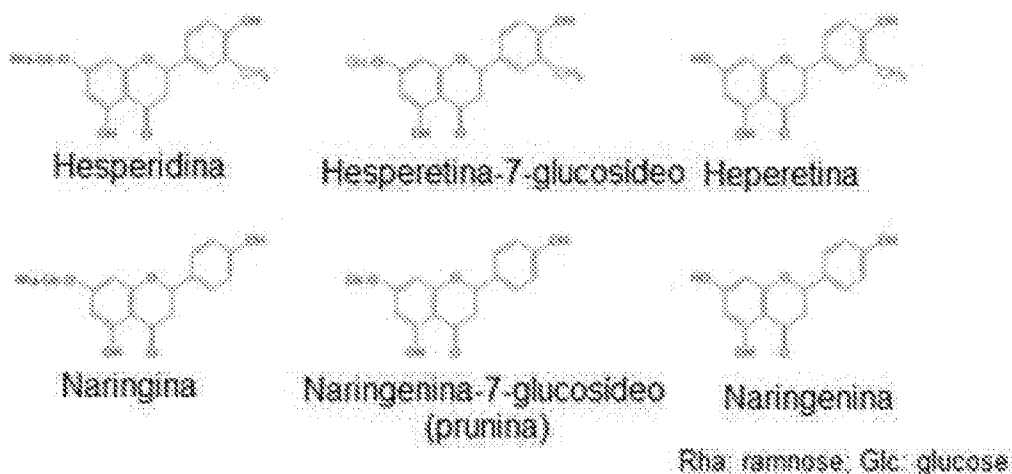
ramnosídeo (hesperidina, rutina, naringina, mitritrina ou similar) através de uma atividade de glucosidase também não está limitada, de modo que estes também são abrangidos no composto de inclusão de flavonoide de acordo com a presente invenção.

[0064] O composto de inclusão de flavonoide formado é um composto de inclusão de um flavonoide sem uma estrutura de ramnosídeo e uma ciclodextrina, conforme mencionado acima. Aqui, um composto de inclusão se refere a um composto formado de maneira tal que uma espécie química forma um espaço de escala molecular e a outra espécie química está incluída no espaço ao combinar o espaço com o formato e as dimensões.

[0065] O flavonoide sem uma estrutura de ramnosídeo inclui isoquercitrina, quercetina, hesperetina-7-glucosídeo, hesperetina, naringenina-7-glucosídeo (prunina), naringenina, luteolina-7-glucosídeo, diosmetina-7-glucosídeo, midretina, eriodictiol-7-glucosídeo, delphinidina-3-glucosídeo, cianidina-3-glucosídeo, isoramnetina-3-glucosídeo, kaempferol-3-glucosídeo, apigenina-7-rutinosídeo, acacetina-7-glucosídeo e assim por diante.

[0066] Exemplos específicos de fórmulas estruturais do flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo e do flavonoide sem uma estrutura de ramnosídeo são mostrados abaixo. As fórmulas estruturais de rutina (RTN), hesperidina (HSP) e naringina (NRG), cada uma tendo uma estrutura de ramnosídeo, e isoquercitrina (IQC), quercetina (QCT), hesperetina-7-glucosídeo (HPT-7G), hesperetina (HPT), naringenina-7-glucosídeo (prunina) (NGN-7G, prunina) e naringenina (NGN), sem uma estrutura de ramnosídeo, são representadas pelas fórmulas a seguir.





[0067] A proporção molar de uma ciclodextrina em um composto de inclusão e um flavonoide sem uma estrutura de ramnosídeo (ciclodextrina/flavonoide) é, de preferência, 0,01 ou mais, mais preferivelmente 0,1 ou mais, ainda mais preferivelmente 0,9 ou mais e, mais preferivelmente, 1,0 ou mais do ponto de vista da eficiência, e a proporção molar é, de preferência, 10,0 ou menos, mais preferivelmente 6,0 ou menos, ainda mais preferivelmente 4,0 ou menos e, mais preferivelmente, 3,0 ou menos do ponto de vista das vantagens econômicas.

[0068] O rendimento do composto de inclusão de flavonoide formado é, de preferência, a partir de 10 a 100%, mais preferivelmente a partir de 40 a 100%, mais preferivelmente a partir de 70 a 100% e, ainda mais preferivelmente, a partir de 90 a 100%. O rendimento é uma conversão percentual de um flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo em um flavonoide sem uma estrutura de ramnosídeo, e o rendimento pode ser calculado de acordo com um método descrito nos Exemplos descritos abaixo. Aqui, a proporção do composto de inclusão de flavonoide formado não está limitada, mesmo quando o composto de inclusão de flavonoide formado é uma mistura de um flavonoide de matéria-prima que tem uma estrutura de ramnosídeo (por exemplo, rutina, hesperidina, naringina ou similar) ou um

flavonoide que pode estar contido em matérias-primas (por exemplo, quercetina, kaempferol-3-rutinosídeo, kaempferol-3-glucosídeo, hesperetina, naringenina e assim por diante), dependendo do teor de flavonoides ou da conversão percentual das matérias-primas usadas.

[0069] No composto de inclusão de flavonoide formado ou na composição que contém um composto de inclusão de flavonoide descrita posteriormente (ambos podem ser coletivamente denominados como "composto de inclusão de flavonoide e assim por diante"), a solubilidade em água de uma porção flavonoide pode depender dos tipos ou das quantidades do flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo e da ciclodextrina usada, e a solubilidade é, de preferência, 0,01% ou mais, mais preferivelmente 0,015% ou mais, ainda mais preferivelmente 0,02% ou mais, mais preferivelmente 1,0% ou mais, ainda mais preferivelmente 2,0% ou mais, mais preferivelmente 2,5% ou mais e, ainda mais preferivelmente, 3% ou mais. Embora o limite máximo não esteja particularmente limitado, o limite máximo pode ser definido, por exemplo, como 20% ou menos. Solubilidade em água de uma porção flavonoide, conforme usado aqui, é uma concentração em porcentagem em massa a 25°C, e a solubilidade pode ser medida de acordo com um método descrito nos Exemplos apresentados abaixo.

[0070] Modalidades específicas serão fornecidas abaixo.

#### Modalidade 1-1

[0071] Um composto de inclusão de flavonoide que contém isoquercitrina com inclusão em  $\gamma$ -ciclodextrina, em que a proporção molar de isoquercitrina e  $\gamma$ -ciclodextrina em um composto de inclusão ( $\gamma$ -ciclodextrina/isoquercitrina) é, de preferência, a partir de 0,9 a 4,0 e, mais preferivelmente, a partir de 0,9 a 1,8 do ponto de vista de redução dos custos de produção, caso no qual a solubilidade em água da isoquercitrina é, de preferência, 0,01% ou mais, mais preferivelmente

2% ou mais, ainda mais preferivelmente 2,5% ou mais e, mais preferivelmente, 3% ou mais.

#### Modalidade 1-2

[0072] Um composto de inclusão de flavonoide que contém isoquercitrina com inclusão em  $\beta$ -ciclodextrina, em que a proporção molar de isoquercitrina e  $\beta$ -ciclodextrina em um composto de inclusão ( $\beta$ -ciclodextrina/isoquercitrina) é a partir de 1,0 a 3,0, caso no qual a solubilidade em água da isoquercitrina é, de preferência, 0,01% ou mais, mais preferivelmente 0,02% ou mais, ainda mais preferivelmente 0,03% ou mais e, mais preferivelmente, 0,05% ou mais.

#### Modalidade 1-3

[0073] Um composto de inclusão de flavonoide que contém hesperetina-7-glucosídeo com inclusão em uma ciclodextrina, em que a proporção molar de hesperetina-7-glucosídeo e ciclodextrina em um composto de inclusão (ciclodextrina/hesperetina-7-glucosídeo) é a partir de 1,0 a 3,0, caso no qual a solubilidade em água da hesperetina-7-glucosídeo é, de preferência, 0,01% ou mais, mais preferivelmente 0,02% ou mais e, ainda mais preferivelmente, 0,03% ou mais.

#### Modalidade 1-4

[0074] Um composto de inclusão de flavonoide que contém naringenina-7-glucosídeo com inclusão em  $\beta$ -ciclodextrina, em que a proporção molar de naringenina-7-glucosídeo e  $\beta$ -ciclodextrina em um composto de inclusão (ciclodextrina/naringenina-7-glucosídeo) é a partir de 1,0 a 3,0, caso no qual a solubilidade em água da naringenina-7-glucosídeo é, de preferência, 0,01% ou mais, mais preferivelmente 0,02% ou mais e, ainda mais preferivelmente, 0,03% ou mais.

[0075] De acordo com o método para a produção de um composto de inclusão de flavonoide da presente invenção, no caso de composto não purificado, é obtida uma composição que contém um composto de inclusão de flavonoide que contém um composto de inclusão de fla-

vonoide e uma ramnose. Neste caso, a proporção molar do flavonoide no composto de inclusão de flavonoide e da ramnose clivada (ramnose/flavonoide) é a partir de 0,8 a 1,2.

[0076] De acordo com o método para produzir um composto de inclusão de flavonoide da presente invenção, em um caso no qual o rendimento acima não é de 100%, o composto de inclusão conteria um flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo como material não reagido. A proporção molar do flavonoide no composto de inclusão de flavonoide e do flavonoide pouco solúvel na composição que contém o composto de inclusão de flavonoide que contém o material não reagido acima (flavonoide/flavonoide pouco solúvel no composto de inclusão) é, de preferência, 0,1 ou menos, mais preferivelmente 0,08 ou menos e, ainda mais preferivelmente, 0,05 ou menos do ponto de vista da estabilidade a longo prazo. O limite mínimo não está particularmente limitado e o limite mínimo pode ser 0,001 ou mais, 0,003 ou mais, 0,004 ou mais e 0,01 ou mais.

[0077] Além disso, surpreendentemente, descobriu-se que a solubilidade de um flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo pode ser melhorada pelo composto de inclusão de flavonoide obtido por meio do método de produção da presente invenção. Mais especificamente, a solubilidade de um flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo pode ser melhorada ao misturar um flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo com um composto de inclusão de flavonoide obtido por meio do método de produção da presente invenção em um meio tal que a proporção molar do flavonoide no composto de inclusão de flavonoide no flavonoide pouco solúvel (flavonoide no composto de inclusão/flavonoide pouco solúvel) seja, de preferência, a partir de 0,1 a 0,9, mais preferivelmente a partir de 0,1 a 0,7 e, ainda mais preferivelmente, a partir de 0,1 a 0,3. Aqui, o termo "meio" se refere a um

meio aquoso ou a uma solução aquosa que contém aditivos alimentícios, tais como sacarídeos, sais, acidulantes, adoçantes, aromatizantes, glicerol ou propileno glicol e alimentos ou fitoterápicos chineses, tais como extratos de limão ou extratos de ervas medicinais chinesas. O método para melhorar a solubilidade pode ser realizado usando diretamente uma composição que contém um composto de inclusão de flavonoide que contém materiais não reagidos ou pode ser realizado ao adicionar um composto de inclusão de flavonoide ou similar ao flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo. Aqui, o flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo e o composto de inclusão de flavonoide obtido por meio do método de produção da presente invenção são aqueles supracitados, os quais incluem uma combinação, por exemplo, de rutina e um composto de inclusão de isoquercitrina- $\gamma$ -ciclodextrina, hesperidina e um composto de inclusão de hesperetina-7-glucosídeo- $\beta$ -ciclodextrina, naringina e um composto de inclusão de narigenina-7-glucosídeo- $\beta$ -ciclodextrina e rutina e um composto de inclusão de narigenina-7-glucosídeo- $\beta$ -ciclodextrina.

[0078] O método para produzir um composto de inclusão de flavonoide da presente invenção não está particularmente limitado quanto à realização de purificação, conforme necessário, além de uma etapa de clivagem, e a purificação pode ser realizada através de uma etapa de tratamento em resina (método de adsorção, método de permuta iônica e assim por diante), uma etapa de tratamento em membrana (método de tratamento em membrana de ultrafiltração, método de tratamento em membrana de osmose reversa, método de tratamento em membrana com potencial zeta ou similar), método de eletrodialise, dessalinização, precipitação ácida, recristalização, um método de fracionamento por solvente ou similar. Por exemplo, a composição que contém um composto de inclusão de flavonoide obtida na etapa de cli-

vagem é adsorvida com um adsorvente poroso sintético, ramnose ou similar é removida através de lavagem com água e, em seguida, a composição é eluída com um álcool e seca por pulverização, pelo que pós purificados podem ser fornecidos. Além disso, após eluição com um álcool, um diluente ou outros aditivos podem estar contidos como componentes diferentes da composição. Aqui, a ramnose ou similar pode ser fracionada e usada nos campos de alimentos, medicamentos, *quasi*-fármacos, cosméticos e assim por diante. Além disso, um flavonoide individualmente pode ser purificado a partir do composto de inclusão de flavonoide produzido.

[0079] O diluente não está particularmente limitado, contanto que o diluente não prejudique os efeitos da presente invenção, e o diluente inclui, por exemplo, sacarídeos, tais como açúcar, glucose, dextrina, amidos, trealose, lactose, maltose, xarope de glucose e açúcar líquido; álcoois, tais como etanol, propileno glicol e glicerol; álcoois de açúcar, tais como sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, xarope de glucose reduzido e manita; ou água. Além disso, os aditivos incluem auxiliares, tais como fosfatos, ácidos orgânicos e quelatos; antioxidantes, tais como ácido ascórbico e assim por diante.

[0080] A seguir, o método para produzir uma composição de glicosídeos de flavonoides da presente invenção será descrito.

[0081] O método para produzir uma composição de glicosídeos de flavonoides da presente invenção inclui uma etapa de glicosidação que inclui o tratamento de um composto de inclusão flavonoide obtido de acordo com o método de produção de um composto de inclusão flavonoide da presente invenção com uma glicosil transferase para submeter o composto de inclusão flavonoide à glicosidação. Em outras palavras, o método inclui uma etapa de clivagem que inclui tratamento de um flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo com uma enzima que tem uma atividade de ramnosidase na presença

de uma ciclodextrina para clivar a ramnose e uma etapa de glicosidação que inclui tratamento do composto de inclusão de flavonoide obtido através da etapa de clivagem acima com uma glicosil transferase para submeter o composto de inclusão de flavonoide à glicosidação.

[0082] A etapa de clivagem e o composto de inclusão de flavonoide obtido por meio da etapa de clivagem são conforme mencionado acima. Aqui, a frase "obtido por meio da etapa de clivagem" não pretende excluir métodos que incluem etapas diferentes da etapa de clivagem, porém, também inclui aqueles obtidos por meio da etapa de purificação opcional ou similar.

[0083] A etapa de glicosidação inclui tratamento de um composto de inclusão de flavonoide obtido por meio da etapa de clivagem com uma glicosil transferase para submeter o composto de inclusão de flavonoide à glicosidação para fornecer uma composição de glicosídeos de flavonoides. Além disso, a etapa de glicosidação pode ser realizada enquanto se deixa repousar em um solvente, tal como água, ou enquanto se agita, da mesma maneira que a etapa de clivagem, o ar no espaço livre no sistema de reação pode ser substituído por um gás inerte, tal como nitrogênio, de modo a evitar a oxidação ou escurecimento da reação, e também um antioxidante, tal como ácido ascórbico, pode ser adicionado ao sistema de reação. A etapa de glicosidação pode ser terminada por meio de um método conhecido, tal como um método que inclui um método de desativação enzimática por meio de aquecimento ou similar.

[0084] Na etapa de glicosidação, uma ciclodextrina do composto de inclusão de flavonoide serve como doador de açúcar e uma composição de glicosídeos de flavonoides pode ser produzida, e não há limitações quanto a doações adicionais do doador de açúcar. Exemplos específicos do doador de açúcar que são adicionalmente doados incluem amido, dextrina, hidrolisados parciais de amido, tais como



malto-oligossacarídeo, xilo-oligossacarídeo, produtos que contêm os mesmos e assim por diante.

[0085] A glicosil transferase não está particularmente limitada, contanto que a enzima tenha uma atividade de glicosil transferase contra o composto de inclusão de flavonoide obtido por meio da etapa de clivagem. Como glicosil transferase, suas origens não estão limitadas e todas as origens, tais como origem animal, origem vegetal e origem de micro-organismos, podem ser usadas. Além disso, a enzima pode ser uma enzima sintética derivada através de uma técnica geneticamente recombinante, hidrólise parcial ou similar. Além disso, a forma da glicosil transferase não está particularmente limitada e pode ser usado um produto seco de uma proteína enzimática, uma enzima imobilizada com um carreador insolúvel, um líquido que contém uma proteína enzimática ou similar.

[0086] Exemplos específicos da glicosil transferase incluem ciclodextrina glucanotransferase, glicosil transferase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\alpha$ -amilase, xilanase, pululanase, arabinofuranosidase e assim por diante.

[0087] A quantidade de glicosil transferase usada é variada, dependendo dos tipos de enzimas usadas, das condições das reações de transferência de glicosilação, dos tipos de sacarídeos e assim por diante. Por exemplo, no caso da ciclodextrina glucanotransferase, a quantidade usada é, de preferência, a partir de 1 a 10.000 U com base em 1 g de um composto de inclusão de flavonoide. Quando um flavonoide pouco solúvel é submetido à glicosidação, geralmente é realizada uma reação enzimática em uma região alcalina para solubilizar um flavonoide pouco solúvel. No entanto, a estabilidade do flavonoide é agravada em uma região alcalina de um pH acima de 7, de modo que o flavonoide provavelmente será decomposto ou escurecido, sendo necessária uma etapa adicional de remoção de produtos escureci-

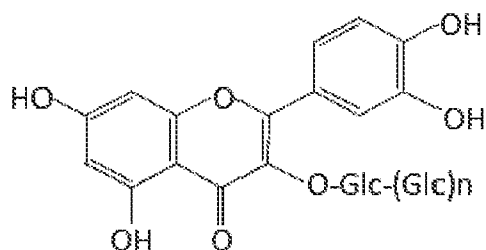
dos e uma etapa de dessalinização por meio de neutralização com um agente alcalino. No entanto, no composto de inclusão de flavonoide obtido de acordo com o método de produção da presente invenção, o flavonoide pouco solúvel é solubilizado em uma alta concentração, mesmo em um pH de 7 ou menos, de modo que uma reação enzimática processe eficientemente a glicosidação, mesmo em um pH de 7 ou menos. Conseqüentemente, o pH é, de preferência, a partir de 3 a 7 e, mais preferivelmente, a partir de 6 a 6,8 do ponto de vista da eficiência ou qualidade da produção. No entanto, a transferência de glicosilação pode ser realizada em uma região alcalina ou a transferência de glicosilação pode ser realizada ao ajustar o pH para uma região alcalina, seguido por ajuste para um pH de 7 ou menos. O solvente usado no sistema de reação inclui um meio aquoso. Além disso, a temperatura da reação é, de preferência, a partir de 40°C a 70°C e, mais preferivelmente, a partir de 50°C a 65°C. Além disso, o tempo de reação é variado, dependendo dos tipos de enzimas e assim por diante, e o tempo de reação pode ser, por exemplo, a partir de 0,5 a 120 horas e, de preferência, a partir de 1 a 30 horas. Além disso, é preferível que, após a etapa de clivagem, a temperatura e o pH sejam continuamente alterados para condições ideais, e uma glicosil transferase seja adicionada à mesma para executar a etapa de glicosidação do ponto de vista da eficiência de produção.

[0088] O modo de ligação dos sacarídeos a um flavonoide pode ser um de uma  $\alpha$ -ligação ou uma  $\beta$ -ligação. Os tipos de sacarídeos a serem ligados não estão particularmente limitados e são preferidos um ou mais membros selecionados a partir de pentoses e hexoses, tais como glucose, galactose e frutose. Além disso, o número de ligações de sacarídeos é, de preferência, a partir de 1 a 30, mais preferivelmente a partir de 1 a 25, ainda mais preferivelmente a partir de 1 a 20, mais preferivelmente a partir de 1 a 15 e, ainda mais preferivelmente,

a partir de 1 a 10. A composição de glicosídeos de flavonoides se refere àquelas que contêm uma mistura de glicosídeos na qual os sacarídeos acima estão ligados a um flavonoide, e a proporção do número de ligações de cada glicosídeo não está limitada e as modalidades a seguir são preferidas do ponto de vista de não prejudicar o sabor dos gêneros alimentícios ou similar.

#### Modalidade 2-1

[0089] Uma composição de glicosídeos de isoquercitrina que contém um composto representado pela fórmula geral (1) a seguir:



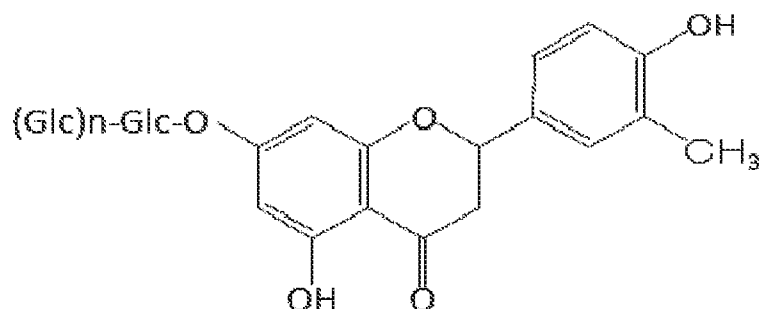
(1)

em que, na fórmula geral (1), Glc significa um resíduo de glucose e n significa um número inteiro de 0 ou 1 ou mais, e

[0090] em que o teor de glicosídeos que tem  $n = 0$  é 10% em mol ou mais e 30% em mol ou menos, o teor de glicosídeos que tem  $n = 1$  a 3 é 50% em mol ou menos e o teor de glicosídeos que tem  $n = 4$  ou mais é 30% em mole ou mais da composição de glicosídeos acima. De preferência, o teor de glicosídeos que tem  $n = 0$  é 10% em mol ou mais e 30% em mol ou menos, o teor de glicosídeos que tem  $n = 1$  a 3 é 35% em mol ou mais e 45% em mol ou menos, e o teor de glicosídeos que tem  $n = 4$  ou mais é 30% em mol ou mais e 50% em mol ou menos.

#### Modalidade 2-2

[0091] Uma composição de glicosídeos de hesperetina-7-glicosídeo que contém um composto representado pela fórmula geral (2) a seguir:



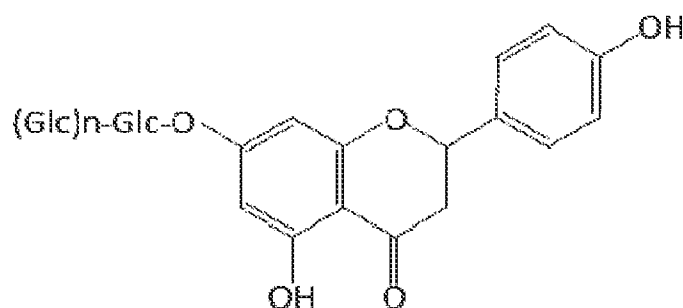
(2)

em que, na fórmula geral (2), Glc significa um resíduo de glucose e n significa um número inteiro de 0 ou 1 ou mais, e

[0092] em que o teor de glicosídeos que tem  $n = 0$  é 10% em mol ou mais e 30% em mol ou menos, o teor de glicosídeos que tem  $n = 1$  a 3 é 50% em mol ou menos e o teor de glicosídeos que tem  $n = 4$  ou mais é 30% em mole ou mais da composição de glicosídeos acima. De preferência, o teor de glicosídeos que tem  $n = 0$  é 10% em mol ou mais e 25% em mol ou menos, o teor de glicosídeos que tem  $n = 1$  a 3 é 35% em mol ou mais e 50% em mol ou menos, e o teor de glicosídeos que tem  $n = 4$  ou mais é 30% em mol ou mais e 50% em mol ou menos.

### Modalidade 2-3

[0093] Uma composição de glicosídeos de naringenina-7-glicosídeo que contém um composto representado pela fórmula geral (3) a seguir:



(3)

em que, na fórmula geral (3), Glc significa um resíduo de glucose e n significa um número inteiro de 0 ou 1 ou mais, e

[0094] em que o teor de glicosídeos que tem  $n = 0$  é 10% em mol

ou mais e 30% em mol ou menos, o teor de glicosídeos que tem  $n = 1$  a 3 é 50% em mol ou menos e o teor de glicosídeos que tem  $n = 4$  ou mais é 30% em mole ou mais da composição de glicosídeos acima.

[0095] Aqui, o número de ligações de um grupo glucose (número  $n$ ) pode ser opcionalmente ajustado. Por exemplo, após formar uma composição de glicosídeos de flavonoides, o número de cadeias de açúcar glicêmico na molécula da composição de glicosídeos de flavonoides pode ser reduzido ao executar tratamento com várias amilases ( $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase, glucoamilase,  $\alpha$ -glucosidase e assim por diante) isoladamente ou em uma combinação das mesmas para fornecer uma composição de glicosídeos de flavonoides com um comprimento opcional da cadeia de açúcar e glucose.

[0096] O método para produzir uma composição de glicosídeos de flavonoides da presente invenção não está particularmente limitado quanto à execução de purificação conforme necessário, além da etapa de clivagem e da etapa de glicosidação, e a purificação pode ser realizada por meio de uma etapa de tratamento de resina (método de adsorção, método de permuta iônica e assim por diante), uma etapa de tratamento em membrana (método de tratamento em membrana de ultrafiltração, método de tratamento em membrana de osmose reversa, método de tratamento em membrana com potencial zeta ou similar), método de eletrodialise, dessalinização, deposição ácida, recristalização, método de fracionamento com solvente ou similar. Por exemplo, a composição de glicosídeos de flavonoides obtida na etapa de glicosidação é adsorvida com um adsorvente poroso sintético para adsorver a composição de glicosídeos, lavada com água, eluída com álcool e posteriormente seca por pulverização para fornecer pós purificados. Além disso, após eluição com um álcool, um diluente ou outros aditivos podem estar contidos como diferentes componentes da composição.

[0097] Exemplos específicos do diluente são os mesmos conforme aqueles listados no método para produzir um composto de inclusão de flavonoide.

[0098] A solubilidade em água da composição de glicosídeos de flavonoides obtida de acordo com o método de produção da presente invenção, calculada como flavonoide é, de preferência, 0,01% ou mais, mais preferivelmente 0,015% ou mais, ainda mais preferivelmente 0,02% ou mais, mais preferivelmente 0,1% ou mais e, ainda mais preferivelmente, 0,5% ou mais. O limite máximo não está particularmente limitado e o limite máximo pode ser definido, por exemplo, como 20% ou menos.

[0099] O composto de inclusão de flavonoide e a composição de glicosídeos de flavonoides obtidos de acordo com o método de produção da presente invenção podem ser fornecidos na forma de alimentos para os quais a capacidade de biodisponibilidade é aprimorada de maneira sustentável por uma combinação com um flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo que tem uma capacidade de biodisponibilidade retardada ou uma composição de glicosídeos de flavonoides que tem uma estrutura de ramnosídeo. As combinações, por exemplo, incluem uma combinação de um composto de inclusão de isoquercitrina e rutina, uma combinação de uma composição de glicosídeos de isoquercitrina e uma composição de glicosídeos de rutina (por exemplo,  $\alpha$ G Rutin, Toyo Sugar Refining Co., Ltda.), uma combinação de um composto de inclusão de hesperetina-7-glicosídeo e uma composição de glicosídeos de hesperidina (por exemplo,  $\alpha$ G Hesperidin, Toyo Sugar Refining Co., Ltda.) e uma combinação de uma composição de glicosídeos de hesperetina-7-glicosídeo e uma composição de glicosídeos de hesperidina (por exemplo, Monoglycosyl Hesperidin, HAYASHIBARA CO., LTDA.).

[00100] Além disso, a composição dos glicosídeos de flavonoides

obtida de acordo com o método de produção da presente invenção é combinada com outro flavonoide pouco solúvel, pelo que a solubilidade do outro flavonoide pouco solúvel pode ser aprimorada. As combinações são, por exemplo, uma combinação de uma composição de glicosídeos de isoquercitrina e rutina, uma combinação de uma composição de glicosídeos de hesperetina-7-glucosídeo e hesperidina e uma combinação de uma composição de glicosídeos de hesperetina-7-glucosídeo e mitritrina. Além disso, sua proporção molar (composição de glicosídeos/outro flavonoide pouco solúvel) é, de preferência, a partir de 0,1 a 0,5, mais preferivelmente a partir de 0,1 a 0,3 e, ainda mais preferivelmente, a partir de 0,1 a 0,15.

[00101] O composto de inclusão de flavonoide e/ou a composição de glicosídeos de flavonoides obtidos de acordo com o método de produção da presente invenção tem uma excelente taxa de absorção corporal e, além disso, excelente prevenção de desvanecimento, prevenção de deterioração de sabores e estabilidade ao armazenamento, de modo que o composto de inclusão de flavonoide e/ou a composição de glicosídeos de flavonoides possa ser adequadamente usada como uma composição para alimentos, uma composição para medicamentos, uma composição para cosméticos e uma composição para aditivos alimentícios. Mais especificamente, o composto de inclusão de flavonoide e/ou a composição de glicosídeos de flavonoides pode ser usada como material antialérgico, antioxidante, antineoplásico, anti-inflamatório, para melhora da flora intestinal, desodorização, supressão da elevação de colesterol no plasma, supressão de elevação da pressão sanguínea, supressão de elevação do nível de açúcar no sangue, supressão de agregação plaquetária, prevenção de demência, queima de gordura corporal, supressão do acúmulo de gordura corporal, melhora da capacidade de permanecer alerta, antifadiga, melhora da sensibilidade ao frio, melhora das condições da pele, restauração

capilar, supressão de amiotrofia ou sono, e também usada como antioxidante, preventivo de desvanecimento e preventivo de deterioração do sabor dos aditivos alimentícios. A composição para aditivos alimentícios é adicionada para evitar a deterioração de um adoçante, um corante, um conservante, um estabilizante, um espessante, um agente descritivo de cor, um agente branqueador, um agente à prova de mofo, uma base de goma, um agente amargo, um agente de brilho, um acidulante, um tempero, um agente emulsificante, um agente de reforço, um agente para produção, um flavorizante ou similar, e pode ser fornecida na forma de uma formulação mista. Em outras palavras, a presente invenção pode fornecer alimentos, medicamentos, cosméticos e assim por diante, cada um contendo um composto de inclusão de flavonoide e/ou uma composição de glicosídeos de flavonoides obtidos de acordo com o método de produção da presente invenção.

[00102] Os gêneros alimentícios incluem alimentos e bebidas, os quais incluem, por exemplo, suplementos nutricionais, alimentos saudáveis, alimentos para uso específico para a saúde, alimentos com função específica, alimentos para terapia dietética, alimentos integrais, suplementos, bebidas de chá, bebidas de café, sucos, bebidas refrescantes, bebidas saudáveis e assim por diante.

[00103] O medicamento inclui fármacos ou *quasi*-fármacos, e os medicamentos são, de preferência, formulações orais ou agentes dérmicos externamente aplicáveis e podem estar na forma de solução, comprimido, grânulo, cápsula, xarope, loção, spray ou pomada.

[00104] Os cosméticos podem estar na forma de creme, loção líquida, loção em emulsão leitosa ou spray.

[00105] A quantidade do composto de inclusão de flavonoide e/ou da composição de glicosídeos de flavonoides misturada no alimento, medicamento ou cosmético da presente invenção não está particularmente limitada, e a quantidade misturada pode ser adequadamente



concebida com referência a uma quantidade de ingestão diária preferida de flavonoides, levando em consideração a solubilidade, o sabor ou similar. Por exemplo, a quantidade do composto de inclusão de flavonoide e/ou da composição de glicosídeos de flavonoides obtidos de acordo com o método de produção da presente invenção misturada na composição para alimentos como uma porção flavonoide pode ser, de preferência, a partir de 0,001 a 30% em massa, mais preferivelmente a partir de 0,01 a 20% em massa e, ainda mais preferivelmente, a partir de 0,02 a 10% em massa, e a quantidade misturada na composição para alimentos pode ser determinada de modo que o composto de inclusão de flavonoide e/ou a composição de glicosídeos de flavonoides possa ser, de preferência, ingerida em uma quantidade a partir de 10 mg a 20 g, mais preferivelmente a partir de 30 mg a 10 g e, ainda mais preferivelmente, a partir de 100 mg a 5 g por dia de uma só vez ou dividida em vários momentos (por exemplo, três vezes). Além disso, a quantidade do composto de inclusão de flavonoide e/ou da composição de glicosídeos de flavonoides misturada à formulação de aditivo alimentício pode ser, de preferência, usada em uma quantidade a partir de 0,001 a 50% em massa, mais preferivelmente a partir de 0,01 a 40% em massa e, ainda mais preferivelmente, a partir de 0,1 a 30% em massa como um volume no qual os flavonoides exibem efeitos.

### EXEMPLOS

[00106] A presente invenção será mais especificamente descrita abaixo através de exemplos, sem pretender limitar o escopo da presente invenção a estes exemplos. Aqui, "%" significa "% em massa", salvo indicação em contrário.

#### Preparação da composição que contém um composto de inclusão de flavonoide

##### Exemplos 1 a 31

[00107] A um béquer de 1.000 ml foram adicionados um flavonoide

pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo (rutina ou hesperidina) e uma ciclodextrina conforme listado na Tabela 1 ou 2, e foi adicionada água para formar uma massa de 1.000 g. A mistura líquida foi ajustada para 70°C e um pH de 4. Em seguida, foram adicionados 3 a 30 g de uma naringinase (Amano Enzyme Inc., 155 u/g) enquanto se agitava, e uma mistura de reação foi reagida durante 24 horas. A temperatura foi ajustada para a temperatura ambiente e a mistura foi filtrada com um papel de filtro para proporcionar um composto de inclusão de um flavonoide sem uma estrutura de ramnosídeo (isoquercitrina ou hesperetina-7-glucosídeo) e uma ciclodextrina e um composto de inclusão de flavonoide que contém composição que contém uma ramnose clivada.

#### Exemplos Comparativos 1 a 3

[00108] Cada uma das composições dos Exemplos Comparativos 1 e 3 foi preparada da mesma maneira conforme os Exemplos 16 e 17, exceto que uma ciclodextrina não foi adicionada. Além disso, a composição do Exemplo Comparativo 2 foi preparada da mesma maneira conforme o Exemplo 16, exceto que uma dextrina foi adicionada no lugar de uma ciclodextrina.

#### Exemplo Comparativo 101

[00109] A um béquero de 100 ml foram adicionados isoquercitrina e  $\gamma$ -ciclodextrina, conforme listado na Tabela 1-2, cada uma das quais foi preparada da seguinte maneira, e foi adicionada água às mesmas para formar uma massa de 100 g. A mistura líquida foi agitada durante 24 horas a 70°C e um pH de 4,5. A temperatura foi, então, ajustada para a temperatura ambiente e a mistura foi filtrada com um papel de filtro para proporcionar uma composição que contém um composto de inclusão de isoquercitrina e  $\gamma$ -ciclodextrina.

#### Preparação de Isoquercitrina

[00110] Foram adicionados dez gramas de rutina usada na Tabela

1 para fazer 100 L de uma solução aquosa e a solução foi ajustada para 70°C e um pH de 4,5. Em seguida, foi adicionado 1 g de uma naringinase (Amano Enzyme Inc., 155 u/g) enquanto se agitava a solução e a mistura líquida foi recuperada e seca para proporcionar 7,2 g de isoquercitrina com um teor de 96% ou mais. Foi confirmado que o produto era idêntico a um reagente de isoquercitrina (Wako) por HPLC.

#### Exemplos 101 a 109

[00111] Cada uma de uma composição que contém um composto de inclusão de naringenina-7-glucosídeo e  $\beta$ -ciclodextrina foi preparada da mesma maneira conforme os Exemplos 1 a 31, exceto que as matérias-primas listadas na Tabela 2-2 foram usadas.

#### Exemplo Comparativo 102

[00112] A composição do Exemplo Comparativo 102 foi preparada da mesma maneira conforme o Exemplo 104, exceto que uma ciclo-dextrina não foi adicionada.

[00113] Os detalhes usados nas Tabelas 1, 1-2, 2 e 2-2 são mostrados abaixo.

RTN: Rutina preparada da seguinte forma.

[00114] Cinquenta quilogramas de gemas de *Sophora* pertencente a *Fabaceae* foram imersos em 500 L de água quente durante 3 horas e um filtrado foi, então, obtido após filtração. Depois disso, o filtrado foi esfriado para a temperatura ambiente e os componentes precipitados foram separados por meio de filtração. Os precipitados foram lavados com água, recristalizados e secos para proporcionar 3,190 g de rutina com um teor de 96% ou mais. Foi confirmado que o produto tinha picos idênticos àqueles de um reagente de rutina (Wako) por HPLC.

HSP: Hesperidina (teor: 97% ou mais, fabricada pela Hamari Chemicals., Ltda.)

NRG: Naringina (teor: 95% ou mais, fabricada pela SIGMA)

$\beta$ -CD:  $\beta$ -ciclodextrina (fabricada pela PEARL ACE CORPORATION)

$\gamma$ -CD:  $\gamma$ -ciclodextrina (fabricada pela PEARL ACE CORPORATION)

Dextrina: Sandec # 70 (fabricada pela Sanwa Starch Co., Ltda.)

#### Conversão Percentual de Rutina em Isoquercitrina

[00115] As misturas líquidas finalizadas na reação antes de filtração dos Exemplos 1 a 16 e dos Exemplos Comparativos 1 e 2 foram usadas como amostras de medição. A partir de uma proporção de acordo com HPLC (SHIMADZU) (área de pico de isoquercitrina/área de pico de rutina) sob as condições de HPLC:

Coluna: CAPCELL PAK C18, TAMANHO 4,6 mm × 250 mm (SHISEIDO),

Eluente: solução aquosa de acetonitrila a 20% (v/v)/ácido fosfórico a 0,1%,

Detecção: 351 nm,

Vazão: 0,4 ml/min,

Temperatura da coluna: 70°C >,

a conversão percentual foi calculada da seguinte forma:

conversão percentual (%) =  $\frac{\text{área de pico de isoquercitrina} \times 100}{(\text{área de pico de rutina} + \text{área de pico de isoquercitrina})}$ .

[00116] Foi confirmado que a isoquercitrina tinha picos idênticos àqueles de um reagente de isoquercitrina (Wako) por HPLC. Todas as conversões percentuais dos Exemplos 1 a 16 foram de 96% ou mais. Por outro lado, a conversão percentual do Exemplo Comparativo 1 foi tão baixa quanto 56% e a conversão percentual do Exemplo Comparativo 2 foi tão baixa quanto 57% comparado com o Exemplo 16 com a mesma quantidade da enzima.

#### Conversão Percentual de Hesperidina em Hesperetina-7-Glucosídeo

[00117] As misturas líquidas finalizadas na reação antes de filtração dos Exemplos 17 a 31 e Exemplo Comparativo 3 foram usadas como amostras de medição. A partir de uma proporção de acordo com HPLC

(SHIMADZU) (área de pico de hesperetina-7-glucosídeo/área de pico de hesperidina) sob as condições de HPLC:

Coluna: CAPCELL PAK C18, TAMANHO 4,6 mm × 250 mm (SHISEIDO),

Eluente: solução aquosa de acetonitrila a 40% (v/v)/ácido fosfórico a 0,1%,

Detecção: 280 nm,

Vazão: 0,4 ml/min,

Temperatura da coluna: 70°C >,

a conversão percentual foi calculada da seguinte forma:

conversão percentual (%) = área de pico de hesperetina-7-glucosídeo × 100/(área de pico de rutina + área de pico de hesperetina-7-glucosídeo). Foi confirmado que a hesperetina-7-glucosídeo tinha picos idênticos àqueles de um produto seco que foi confirmado como sendo hesperetina-7-glucosídeo por RMN. Todas as conversões percentuais dos Exemplos 17 a 31 foram de 96% ou mais. Por outro lado, a convenção percentual do Exemplo Comparativo 3 foi tão baixa quanto 57%.

#### Conversão Percentual de Naringina em Naringenina-7-Glucosídeo

[00118] As misturas líquidas finalizadas na reação antes de filtração dos Exemplos 101 a 109 e Exemplo Comparativo 102 foram usadas como amostras de medição. A partir de uma proporção de acordo com HPLC (SHIMADZU) (área de pico de naringenina-7-glucosídeo/área de pico de naringina) sob as condições de HPLC:

Coluna: CAPCELL PAK C18, TAMANHO 4,6 mm × 250 mm (SHISEIDO),

Eluente: solução de aquosa de acetonitrila a 25% (v/v)/ácido fosfórico a 0,1%,

Detecção: 280 nm,

Vazão: 0,4 ml/min,

Temperatura da coluna: 70°C >, a conversão percentual foi calculada.

[00119] Especificamente, a porcentagem de conversão foi calculada da seguinte maneira:

percentagem de conversão (%) =  $\frac{\text{área de pico de naringenina-7-glucosídeo} \times 100}{(\text{área de pico de naringina} + \text{área de pico de naringenina-7-glucosídeo})}$ .

[00120] Foi confirmado que a naringenina-7-glucosídeo tinha picos idênticos àqueles de um reagente de naringenina-7-glucosídeo (Wako) por HPLC. As conversões percentuais dos Exemplos 101 a 109 e Exemplo Comparativo 102 foram de 95% ou mais.

#### Concentração de Isoquercitrina (IQC) (Análise Absortiométrica)

[00121] As misturas líquidas finalizadas na reação dos Exemplos 1 a 16 e Exemplos Comparativos 1, 2 e 101 foram deixadas repousar em temperatura ambiente e 1 ml de sobrenadante foi, então, filtrado para ser usado como amostras de medição. Uma curva de calibração foi traçada em uma absorvância de 351 nm (solução de ácido fosfórico a 0,1%) usando um reagente de rutina (Wako). A concentração de rutina foi calculada a partir da absorvância das amostras de medição e o valor calculado ao compensar com uma porcentagem e multiplicar o produto por um fator de 0,761 (proporção em peso molecular de isoquercitrina/rutina ( $464,38/610,52 = 0,761$ )) foi obtido como uma concentração de isoquercitrina. Os resultados são mostrados na Tabela 1 e 1-2. Aqui, a conversão percentual no momento de cálculo da concentração foi calculada após submeter as mesmas amostras que aquelas para a análise de concentração à determinação por HPLC.

#### Concentração de Hesperetina-7-Glucosídeo (HPT-7G) (Análise Absortiométrica)

[00122] As misturas líquidas finalizadas na reação dos Exemplos 17 a 31 e Exemplo Comparativo 3 foram deixadas repousar em tempera-

tura ambiente e 1 ml de sobrenadante foi, então, filtrado para ser usado como amostras de medição. Uma curva de calibração foi traçada em uma absorbância de 280 nm (solução de ácido fosfórico a 0,1%) usando um reagente de hesperidina (Wako). A concentração de hesperidina foi calculada a partir da absorbância das amostras de medição e o valor calculado ao compensar com uma porcentagem de conversão de acordo com a análise por HPLC e multiplicar o produto por um fator de 0,761 (proporção em peso molecular de hesperetina-7-glucosídeo/hesperidina ( $464,42/610,56 = 0,761$ )) foi obtido como uma concentração de hesperetina-7-glucosídeo. Os resultados são mostrados na Tabela 2. Aqui, a conversão percentual no momento de cálculo da concentração foi calculada após submeter as mesmas amostras que aquelas para análise de concentração à determinação por HPLC.

Concentração de Naringenina-7-Glucosídeo (NGN-7G) (Análise Absor-tiométrica)

[00123] As misturas líquidas finalizadas na reação dos Exemplos 101 a 109 e Exemplo Comparativo 102 foram deixadas repousar em temperatura ambiente e 1 ml de sobrenadante foi, então, filtrado para ser usado como amostras de medição. Uma curva de calibração foi traçada em uma absorbância de 280 nm (solução de ácido fosfórico a 0,1%) usando um reagente de naringina (fabricado pela SIGMA, daqui em diante NRG). A concentração de naringina foi, então, calculada a partir da absorbância das amostras de medição e o valor calculado ao compensar com uma porcentagem de conversões de acordo com a análise por HPLC e multiplicar o produto por um fator de 0,748 (proporção em peso molecular de naringina/naringenina-7-glucosídeo ( $434,39/580,54 = 0,748$ )) foi obtido como a concentração de naringeni-na-7-glucosídeo. Os resultados são mostrados na Tabela 2-2. Aqui, a conversão percentual no momento de cálculo da concentração foi calculada após submeter as mesmas amostras que aquelas para análise

de concentração à determinação por HPLC.

Proporção Molar (CD/IQC (Proporção Molar), CD/HPT-7G (Proporção Molar) e CD/NGN-7G (Proporção Molar)) (Análise de Sacarídeos por HPLC)

[00124] As misturas líquidas finalizadas na reação dos Exemplos 1 a 31 e 101 a 109 e o Exemplo Comparativo 101 foram deixadas repousar em temperatura ambiente e 1 ml de sobrenadante foi, então, filtrado para ser usado como amostras de medição. Uma curva de calibração é traçada com  $\beta$ -ciclodextrina (Wako) e  $\gamma$ -ciclodextrina (Wako), de acordo com a análise por HPLC (SHIMADZU) sob condições da HPLC:

Coluna: Inertsil NH<sub>2</sub> (4,6 × 150 mm (GL Science Inc.)),

Eluente: acetonitrila/água a 65% (v/v),

Detecção: refratômetro diferencial, RID-10A (SHIMADZU),

Vazão: 1 ml/min,

Temperatura da coluna: 40°C >, e

a concentração molar de ciclodextrina das amostras foi, então, calculada e a proporção molar de ciclodextrina/isoquercitrina, ciclodextrina/hesperetina-7-glucosídeo e ciclodextrina/naringenina-7-glucosídeo foi calculada com uma concentração molar de isoquercitrina, hesperetina-7-glucosídeo e naringenina-7-glucosídeo. Os resultados são mostrados nas Tabelas 1, 1-2, 2 e 2-2. Aqui, a proporção molar do filtrado após término da reação foi a mesma no caso de produtos liofilizados.

Solubilidade (Solubilidade de IQC, Solubilidade de HPT-7G e Solubilidade de NGN-7G)

[00125] As misturas líquidas finalizadas na reação dos Exemplos 1 a 31 e 101 a 109 e os Exemplos Comparativos 1 a 3, 101 e 102 foram deixadas repousar em temperatura ambiente, depois filtradas e liofilizadas para proporcionar produtos secos. Os produtos secos preparados acima foram adicionados a um béquer de 100 ml que contém 50



ml de água a 50°C com agitação até que os produtos secos não fossem mais dissolvidos e precipitados. A mistura líquida foi deixada repousar em temperatura ambiente (25°C), 1 ml do sobrenadante foi, então, filtrado e a concentração de isoquercitrina, a concentração de hesperetina-7-glicosídeo e a concentração de naringenina-7-glicosídeo foram calculadas de acordo com a análise de absorção para obter a solubilidade. No entanto, quando a quantidade dos produtos secos era insuficiente no momento de determinação da solubilidade, os mesmos experimentos exemplificativos foram realizados repetidamente para obter a quantidade necessária e a solubilidade foi medida. Além disso, foi confirmado com um calorímetro de varredura diferencial (DSC), ressonância magnética nuclear (RMN) e um espectrofotômetro de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) que, nos Exemplos 1 a 31 e 101 a 109 e Exemplo Comparativo 101, o flavonóide foi incluído com uma ciclodextrina. Os resultados de solubilidade são mostrados nas Tabelas 1, 1-2, 2 e 2-2. Aqui, os produtos liofilizados dos compostos de inclusão de flavonóides nos quais a ramnose foi removida por meio de diálise do filtrado em temperatura ambiente após o término da reação nos Exemplos 1 a 31 e 101 a 109 também mostraram quase os mesmos níveis de solubilidade.

**Tabela 1**

	(1) RTN (% em massa)	2) β-CD (% em massa)	(3) γ-CD (% em massa)	4) Dextrina (% em massa)	(5) CD/RTN (propor- ção molar)	(6) IQC Conc. (% em massa)	(7) CD/IQC (pro- porção molar)	(8) Solubilidade de IQC (% em massa)
Ex. 1	2,0	5,6	0	0	1,5	1,5	1,5	1,6
Ex. 2	2,0	7,4	0	0	2,0	1,6	2,0	1,1
Ex. 3	3,0	11,2	0	0	2,0	2,4	1,9	1,0
Ex. 4	3,0	16,7	0	0	3,0	2,3	3,0	0,8
Ex. 5	4,0	14,9	0	0	2,0	3,0	2,0	1,2
Ex. 6	4,0	22,3	0	0	3,0	3,1	2,9	0,8
Ex. 7	4,0	0,15	0	0	0,02	0,03	2,0	1,1
Ex. 8	4,0	0	0,08	0	0,01	0,03	1,0	9,9
Ex. 9	4,0	0	7,6	0	0,9	3,0	0,9	10,2
Ex. 10	4,0	0	8,5	0	1,0	3,0	1,0	10,2
Ex. 11	4,0	0	12,7	0	1,5	3,0	1,5	8,9
Ex. 12	4,0	0	15,3	0	1,8	3,1	1,8	7,7
Ex. 13	4,0	0	17,0	0	2,0	3,1	2,0	6,4
Ex. 14	4,0	0	25,4	0	3,0	3,0	3,0	4,2
Ex. 15	4,0	0	33,9	0	4,0	3,1	4,0	3,2
Ex. 16	8,0	0	17,0	0	1,0	6,2	1,0	9,6
Ex. Comp. 1	8,0	0	0	0	-	0,01	-	0,01
Ex. Comp. 2	8,0	0	0	17,0	-	0,01	-	0,01

**Notas da Tabela 1**

(1) Concentração de rutina no momento de início da reação (% em massa)

(2) concentração de β-ciclodextrina no momento de início da reação (% em massa)

- (3) concentração de  $\gamma$ -ciclodextrina no momento de início da reação (% em massa)
- (4) Concentração de dextrina no momento de início da reação (% em massa)
- (5) Ciclodextrina/rutina no momento de início da reação (proporção molar)
- (6) Concentração de isoquercitrina do filtrado após o término da reação (% em massa)
- (7) Ciclodextrina/isoquercitrina do filtrado após o término da reação (proporção molar)
- (8) Solubilidade de isoquercitrina do produto liofilizado do filtrado após o término da reação (% em massa)

**Tabela 1-2**

	(11) IQC (% em massa)	(12) $\gamma$ -CD (% em massa)	(13) CD/IQC (proporção molar)	(14) IQC Conc. (% em massa)	(15) CD/IQC (proporção molar)	(16) Solubilidade de IQC (% em massa)
Ex. Comp. 101	3,0	8,4	1,0	0,36	8,4	0,8

**Notas da Tabela 1-2**

- (11) Concentração de isoquercitrina no momento de início do aquecimento enquanto se agita (% em massa)
- (12) Concentração de  $\gamma$ -ciclodextrina no momento de início do aquecimento enquanto se agita (% em massa)
- (13) Ciclodextrina/isoquercitrina no momento de início do aquecimento enquanto se agita (proporção molar)
- (14) Concentração de isoquercitrina do filtrado após aquecimento enquanto se agita (% em massa)
- (15) Ciclodextrina/isoquercitrina do filtrado após aquecimento enquanto se agita (proporção molar)
- (16) Solubilidade de isoquercitrina do produto liofilizado do filtrado após aquecimento enquanto se agita (% em massa)

[00126] Conforme é evidente a partir da Tabela 1, pode ser visto que um composto de inclusão de isoquercitrina e uma ciclodextrina pode ser obtido de forma eficiente juntamente com a reação de clivagem de ramnose a partir de rutina de acordo com o método de produção da presente invenção. Por outro lado, os Exemplos Comparativos 1 e 2 tiveram uma baixa porcentagem de conversões e também uma baixa solubilidade. Aqui, as misturas de reação líquidas e as misturas líquidas finalizadas na reação dos Exemplos 7 e 8 e Exemplos Comparativos 1 a 3 estavam em estado suspenso. No entanto, as misturas de reação líquidas dos Exemplos 1 a 6 e 9 a 16 estavam em um estado suspenso no estágio inicial da reação e no estágio intermediário da reação, porém, as misturas de reação líquidas foram dissolvidas no momento de término da reação e no momento subsequente de permitir que as misturas de reação líquidas permaneçam em temperatura ambiente. Portanto, a porcentagem de inclusão de um composto de inclusão de isoquercitrina-ciclodextrina (concentração de isoquercitrina em um composto de inclusão (concentração de filtrado que é deixado repousar em temperatura ambiente após o término da reação)  $\times$  100/concentração de isoquercitrina na mistura líquida finalizada na reação (mistura líquida antes de filtração)) foi de quase 100%. No entanto, como o Exemplo Comparativo 101 da Tabela 1-2, a mera mistura e aquecimento de isoquercitrina e  $\gamma$ -ciclodextrina da mesma composição que o Exemplo 10 sempre estaria em estado suspenso do início ao final da reação e a taxa de inclusão (concentração de isoquercitrina em um composto de inclusão (concentração do filtrado que é deixado repousar em temperatura ambiente após o término da reação)  $\times$  100/concentração de isoquercitrina na mistura líquida finalizada na reação (mistura líquida antes de filtração)) também foi tão baixa quanto 12% e, também, a solubilidade do produto liofilizado do filtrado era baixa.

**Tabela 2**

	(21) HSP (% em massa)	(22) β-CD (% em massa)	(23) γ-CD (% em massa)	(24) CD/HSP (pro- porção molar)	(25) HPT-7G Conc. (% em massa)	(26) CD/HPT-7G (pro- porção molar)	(27) Solubilidade de HPT- 7G (% em massa)
Ex. 17	3,0	0,08	0	0,01	0,022	1,5	3,5
Ex. 18	3,0	7,3	0	1,3	2,3	1,3	3,8
Ex. 19	3,0	8,4	0	1,5	2,3	1,5	3,6
Ex. 20	3,0	11,2	0	2,0	2,3	2,0	2,8
Ex. 21	3,0	16,7	0	3,0	2,3	3,0	2,0
Ex. 22	4,0	11,2	0	1,5	2,9	1,6	3,5
Ex. 23	4,0	14,9	0	2,0	3,0	2,0	2,7
Ex. 24	2,0	0	6,4	1,5	1,4	1,6	4,0
Ex. 25	2,0	0	8,5	2,0	1,6	1,9	3,8
Ex. 26	4,0	0	0,08	0,01	0,015	2,0	3,7
Ex. 27	4,0	0	12,7	1,5	3,1	1,5	4,2
Ex. 28.	4,0	0	17,0	2,0	2,9	2,1	3,7
Ex. 29	5,0	0	15,9	1,5	3,7	1,5	4,1
Ex. 30	5,0	0	21,2	2,0	3,9	1,9	3,8
Ex. 31	5,0	0	31,8	3,0	3,8	3,0	2,7
Ex. Comp. 3	3,0	0	0	-	0,007	-	0,007

## Notas da Tabela 2

(21) Concentração de hesperidina no momento de início da reação (% em massa)

(22) Concentração de  $\beta$ -ciclodextrina no momento de início da reação (% em massa)

(23) Concentração de  $\gamma$ -ciclodextrina no momento de início da reação (% em massa)

(24) Ciclodextrina/hesperidina no momento de início da reação (proporção molar)

(25) Concentração de hesperetina-7-glucosídeo do filtrado após o término da reação (% em massa)

(26) Ciclodextrina/hesperetina-7-glucosídeo do filtrado após o término da reação (proporção molar)

(27) Solubilidade de hesperetina-7-glucosídeo do produto liofilizado do filtrado após o término da reação (% em massa)

[00127] Conforme é evidente a partir da Tabela 2, pode ser visto que um composto de inclusão de hesperitina-7-glucosídeo e uma ciclodextrina foi obtido de forma eficiente juntamente com a reação de clivagem de ramnose a partir de hesperidina de acordo com o método de produção da presente invenção. Por outro lado, o Exemplo Comparativo 3 teve uma baixa porcentagem de conversão e também uma baixa solubilidade. Aqui, as misturas de reação líquidas e as misturas líquidas finalizadas na reação dos Exemplos 17 e 26 e Exemplo Comparativo 3 estavam em um estado suspenso. No entanto, as misturas de reação líquidas dos Exemplos 18 a 25 e Exemplos 27 a 31 estavam em estado suspenso no estágio inicial da reação e no estágio intermediário da reação, porém, as misturas de reação líquidas foram dissolvidas no momento de término do processo de reação e no momento em que a mistura líquida foi deixada repousar em temperatura ambiente. Além disso, a porcentagem de inclusão na qual um composto de

inclusão de hesperetina-7-glicosídeo-ciclodextrina foi formado (concentração de hesperetina-7-glicosídeo no composto de inclusão (concentração do filtrado que é deixado em temperatura ambiente após o término da reação)/concentração de hesperetina-7-glicosídeo × 100 da reação líquida finalizada na reação (mistura líquida antes de filtração)) foi de quase 100%.

**Tabela 2-2**

	(31) NRG (% em massa)	(32) β-CD (% em massa)	(33) CD/NRG (proporção molar)
Ex. 101	1,0	2,0	1,0
Ex. 102	1,0	3,9	2,0
Ex. 103	1,0	5,9	3,0
Ex. 104	2,0	3,9	1,0
Ex. 105	2,0	7,8	2,0
Ex. 106	2,0	11,8	3,0
Ex. 107	4,0	7,8	1,0
Ex. 108	5,0	9,8	1,0
Ex. 109	6,0	11,8	1,0
Ex. Comp. 102	2,0	0	0

**Tabela 2-2 -continuação-**

	(34) NGN-7G Conc. (% em massa)	(35) CD/NGN-7G (proporção molar)	(36) Solubilidade de NGN-7G (% em massa)
Ex. 101	0,75	1,0	10,1
Ex. 102	0,75	2,0	5,5
Ex. 103	0,75	3,0	3,7
Ex. 104	1,5	1,0	10,6
Ex. 105	1,5	2,0	5,2
Ex. 106	1,5	3,0	3,5
Ex. 107	3,0	1,0	10,5
Ex. 108	3,7	1,0	10,3
Ex. 109	4,5	1,0	10,7
Ex. Comp. 102	0,3	0	0,2

## Notas da Tabela 2-2

(31) Concentração de naringina no momento de início da reação (% em massa)

(32) Concentração de  $\beta$ -ciclodextrina no momento de início da reação (% em massa)

(33) Ciclodextrina/naringina no momento de início da reação (proporção molar)

(34) Concentração de naringenina-7-glucosídeo do filtrado após o término da reação (% em massa)

(35) Ciclodextrina/naringenina-7-glucosídeo do filtrado após o término da reação (proporção molar)

(36) Solubilidade de naringenina-7-glucosídeo do produto liofilizado do filtrado após o término da reação (% em massa)

[00128] Conforme é evidente a partir da Tabela 2-2, de acordo com o método de produção da presente invenção, um composto de inclusão de naringenina-7-glucosídeo e  $\beta$  ciclodextrina foi obtido com eficiência, juntamente com a reação de clivagem de ramnose a partir da naringina, e também a solubilidade foi aprimorada. Embora o Exemplo Comparativo 102 tenha tido uma conversão percentual de 95% ou mais, uma vez que os precipitados foram formados imediatamente após a mistura líquida ter sido deixada repousar em temperatura ambiente após o término da reação, a solubilidade era baixa. No entanto, após o término das reações dos Exemplos 101 a 109, os filtrados que foram deixados repousar em temperatura ambiente foram dissolvidos e a porcentagem de inclusão na qual um composto de inclusão de naringenina-7-glucosídeo-ciclodextrina foi formado (concentração de naringenina-7-glicosídeo no composto de inclusão (concentração do filtrado que é deixado repousar em temperatura ambiente após o término da reação)  $\times$  100/concentração de naringenina-7-glucosídeo da mistura líquida finalizada na reação (mistura líquida antes de filtração))



foi quase 100%.

#### Proporção Molar na Composição que Contém um Composto de Inclusão de Flavonoide (Ramnose/Flavonoide)

[00129] Além disso, o teor de ramnose dos filtrados após o término da reação dos Exemplos 18 a 25, 27 a 31 e 101 a 109 foi medido (uma curva de calibração foi traçada com ramnose (Wako) sob as mesmas condições conforme a análise de sacarídeos por HPLC). Então, a concentração molar de ramnose foi calculada. Como um resultado, a proporção molar de flavonoide em um composto de inclusão (ramnose/flavonoide) foi de 0,8 a 1,2.

#### Avaliações de Sabor do Composto de Inclusão de Flavonoide

[00130] Cem mililitros de cada uma das misturas líquidas finalizadas na reação dos Exemplos 10 a 15 foram colocados em uma membrana de diálise (Spectra/Por CE, Dialysis Tube, MWCO 500-1000, fabricada pela Funakoshi). A diálise foi realizada em 10 L de água (trocada cinco vezes por água a 10°C) para remover a ramnose e cada mistura líquida foi, então, liofilizada para proporcionar 10 g a 30 g de produtos secos. Os produtos secos obtidos foram adicionados a uma água gaseificada comercialmente disponível (sem açúcar) ("*Minami-Alps Tennensui, Sparkling*", fabricada pela Suntory), bebida de café (sem açúcar) ("*WONDA GOLD, BLACK*", fabricada pela Asahi Soft Drinks Co., Ltda.) e chá verde ("*Oi Ocha*", fabricado pela ITO EN, LTDA.) em uma concentração a qual é um valor calculado de 0,1% em massa em termos de conversão de isoquercitrina e avaliações sensoriais de sabor e doçura foram feitas por cinco participantes do painel usando um produto sem aditivos como controle. De acordo com os seguintes critérios de avaliação, foi calculada uma pontuação média para cada um. Os resultados são mostrados na Tabela 3.

#### Critérios de Avaliação de Intensidade de Sabor

1: Sabor residual de gosto forte

- 2: Sabor residual de gosto ligeiramente forte
- 3: Sabor residual de gosto ruim
- 4: Sabor residual de gosto leve
- 5: Sem sabor residual

#### Cr terios de Avalia o de Doçura

- 1: Doçura de gosto forte
- 2: Doçura de gosto ligeiramente forte
- 3: Doçura de gosto ruim
- 4: Doçura de gosto leve
- 5: Sem doçura

**Tabela 3**

	$\gamma$ CD/IQC (proporoo molar)	Bebida Carbonada		Bebidas de caf�		Ch verde	
		Sabor residual	Doçura	Sabor residual	Doçura	Sabor residual	Doçura
Ex. 10	1,0	4,1	4,0	4,0	3,9	4,1	4,0
Ex. 11	1,5	4,0	3,9	3,8	3,7	4,0	4,0
Ex. 12	1,8	3,7	3,6	3,8	3,7	3,5	3,4
Ex. 13	2,0	1,3	2,6	1,3	2,5	1,4	2,7
Ex. 14	3,0	1,3	2,2	1,2	2,3	1,3	2,4
Ex. 15	4,0	1,1	1,9	1,1	2,1	1,1	1,9

[00131] Conforme   evidente a partir a Tabela 3, pode ser observado que, quando os produtos apresentam proporoes molares ( $\gamma$ CD/IQC) de 1,0 a 1,8, o sabor residual e a doçura so reduzidos comparado com aqueles que apresentam proporoes molares de 2,0 a 4,0, de modo que estes produtos so os preferidos do ponto de vista de reduzir os efeitos sobre os sabores de alimentos, tais como bebidas. Al m disso, embora no seja mostrado na tabela, quando se trata de um composto de incluso de hesperetina-7-glicos deo, quando a proporoo molar (CD/HPT-7G)   a partir de 1,0 a 1,9, o sabor residual (sabor diferente do sabor do aditivo produto isento de agrot xicos) e doçura so reduzidos comparado com aqueles que apresentam pro-

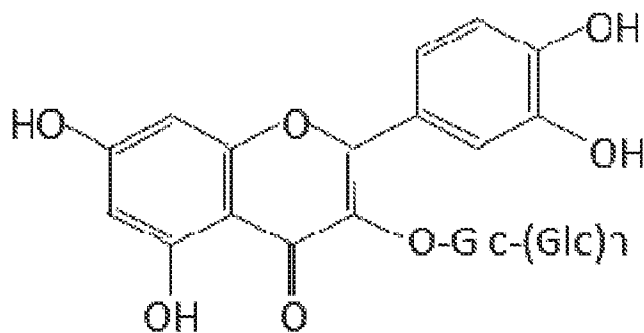
porções molares de 2,0 a 3,0, de modo que estes produtos podem ser adequadamente usados em alimentos.

#### Preparação de Composição de Glicosídeos de Flavonoides

##### Exemplos 32 a 39

[00132] Foi adicionada uma pequena quantidade de um álcali à mistura de reação líquida preparada no Exemplo 4 (70°C, pH de 4,5 e concentração de isoquercitrina: 2,3% em massa) para ajustar seu pH de 6,5 a 60°C. Depois disso, 20 g de ciclodextrina glucanotransferase (CGTase: Amano Enzyme Inc., nome comercial "Contizyme", 600 U/ml) foram adicionados à mesma para iniciar a reação e a reação foi mantida durante 24 horas. A mistura de reação líquida obtida foi terminantemente esterilizada e filtrada e a mistura de reação líquida foi liofilizada para proporcionar 158 g de uma composição de glicosídeos de isoquercitrina que contém um composto representado pela fórmula geral (1) (Amostra 1). A solubilidade da composição obtida dos glicosídeos de isoquercitrina (Amostra 1) em água foi um valor calculado em 2,7% em termos da conversão de isoquercitrina. A composição obtida dos glicosídeos de isoquercitrina (Amostra 1) foi dissolvida em água e a solução foi deixada fluir através de uma coluna empacotada com Diaion HP-20 (resina de adsorção sintética porosa, fabricada pela Mitsubishi Chemical Corporation) para permitir que a composição de glicosídeos de isoquercitrina fosse adsorvida na coluna e a coluna foi lavada com água em um volume duas vezes maior do que aquele da resina para remover os sacarídeos, tal como ramnose, da coluna. Depois disso, a solução eluída na qual o componente adsorvido foi eluído com etanol a 65% (v/v) em um volume duas vezes maior do que aquele da resina foi concentrada e os componentes concentrados foram, então, liofilizados para proporcionar uma composição de glicosídeos do Exemplo 39. O cromatograma de HPLC do Exemplo 39 é mostrado na Figura 1. Os resultados foram os mesmos conforme para o cromatograma

tograma por HPLC da Amostra 1. Além disso, a composição dos glicosídeos de isoquercitrina (Amostra 1) foi adsorvida e lavada com água da mesma maneira conforme no Exemplo 39, e a composição foi eluída com etanol em uma concentração de 10 a 60% (v/v). As soluções nas quais a proporção molar foi ajustada ao combinar as soluções eluídas (soluções eluídas a 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 60% (v/v)) foram concentradas e depois liofilizadas para proporcionar composições de glicosídeos dos Exemplos 32 a 38. A solubilidade das composições dos glicosídeos dos Exemplos 32 a 39 em água foi um valor calculado em 10% ou mais em termos da conversão de isoquercitrina. Aqui, no momento da reação de transglicosilação, quando misturas líquidas de reação em pHs de 7,5 e 8,5 foram preparadas com a mesma quantidade de enzima, foram produzidas composições de glicosídeos de isoquercitrina quase nas mesmas quantidades. No entanto, a cor da solução ficou marrom escuro em virtude de uma decomposição parcial do flavonoide, de modo que a composição reagiu em um pH de 6,5. Aqui, também nas misturas líquidas de reação preparadas nos Exemplos 1 a 3 e 10 a 16, foram produzidas composições de glicosídeos de isoquercitrina com o mesmo cromatograma de HPLC que a Amostra 1 (Figura 1) sob as mesmas condições.



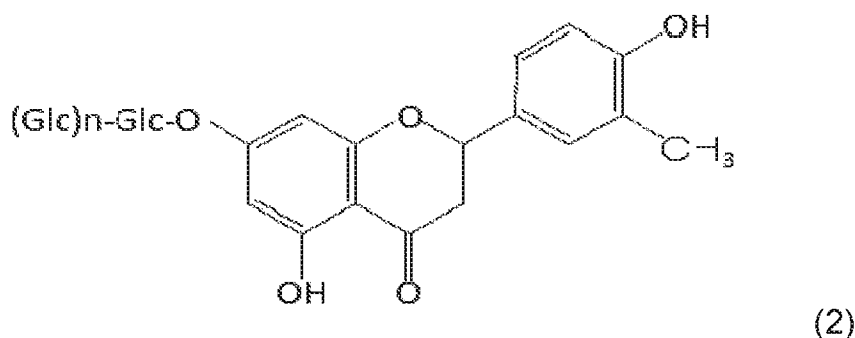
(1)

onde, na fórmula geral (1), Glc significa um resíduo de glucose e n significa um número inteiro de 0 ou 1 ou mais.

Exemplos 40 a 46

[00133] Foi adicionada uma pequena quantidade de um álcali à mistura de reação líquida preparada no Exemplo 22 (70°C, pH de 4,5, concentração de hesperetina-7-glicosídeo: 2,9% em massa) para ajustar seu pH de 6,5 a 60°C. Depois disso, 5 g de ciclodextrina glucanotransferase (CGTase: Amano Enzyme Inc., nome comercial "Con-tizyme", 600 U/ml) foram adicionados à mesma para iniciar a reação e a reação foi mantida durante 24 horas. A mistura de reação líquida obtida foi termicamente esterilizada e filtrada e a mistura de reação líquida foi, então, seca por pulverização para proporcionar 136 g de uma composição de glicosídeos de hesperetina-7-glicosídeo que contém um composto representado pela fórmula geral (2) (Amostra 2). A solubilidade da composição obtida dos glicosídeos de hesperetina-7-glicosídeo (Amostra 2) em água foi um valor calculado em 5,1% em termos de conversão de hesperetina-7-glicosídeo. A composição dos glicosídeos de hesperetina-7-glicosídeo obtida (Amostra 2) foi dissolvida em água e a solução foi deixada fluir através de uma coluna empacotada com Diaion HP-20 (resina de adsorção sintética porosa, fabricada pela Mitsubishi Chemical Corporation) para permitir que a composição dos glicosídeos de hesperetina-7-glicosídeo fosse adsorvida na coluna e a coluna foi lavada com água em um volume duas vezes maior do que aquele para remover os sacarídeos, tal como ramnose, da coluna. Posteriormente, a solução eluída na qual o componente adsorvido foi eluído com um etanol a 65% (v/v) em um volume duas vezes maior do que aquele da resina foi concentrada e os componentes concentrados foram liofilizados para proporcionar uma composição de glicosídeos do Exemplo 40. O cromatograma de HPLC do Exemplo 40 é mostrado na Figura 2. Os resultados foram os mesmos para o cromatograma por HPLC da Amostra 2. Além disso, a composição dos glicosídeos de hesperetina-7-glicosídeo (amostra 2) foi adsorvida e

lavada com água da mesma maneira conforme o Exemplo 40 e a composição foi depois eluída com etanol em uma concentração de 10 a 60% (v/v) que foi usada na eluição. As soluções nas quais a proporção molar foi ajustada ao combinar as soluções eluídas (10, 20, 30, 40, 50 e 60% (v/v)) foram concentradas e depois liofilizadas para proporcionar composições de glicosídeos dos Exemplos 41 a 46. A solubilidade das composições dos glicosídeos dos Exemplos 40 a 46 em água foi um valor calculado como 10% ou mais em termos de conversão de hesperetina-7-glicosídeo. Aqui, no momento da reação de transglicosilação, quando misturas líquidas de reação nos pHs de 7,5 e 8,5 foram preparadas com a mesma quantidade de enzima, foram produzidas composições de glicosídeos de hesperetina-7-glicosídeo quase nas mesmas quantidades. No entanto, a cor da solução ficou marrom escuro em virtude de uma decomposição parcial do flavonóide, de modo que a composição reagiu em um pH de 6,5. Aqui, também nas misturas líquidas de reação preparadas nos Exemplos 21, 23 e 27 a 31, foram produzidas composições de glicosídeos de isoquercitrina com o mesmo cromatograma de HPLC que a Amostra 2 (Figura 2) sob as mesmas condições.



onde, na fórmula geral (2), Glc significa um resíduo de glucose e n significa um número inteiro de 0 ou 1 ou mais.

Solubilidade (Valor Calculado Como IQC, Valor Calculado Como HPT-7G)

[00134] As solubilidades das amostras 1 e 2 e as composições de

glicosídeos de flavonoides dos Exemplos 32 a 46 foram obtidas ao calcular a concentração de isoquercitrina e a concentração de hesperetina-7-glucosídeo de acordo com os mesmos métodos conforme aqueles para a solubilidade de IQC e a solubilidade de HPT-7G supracitados para definir um valor calculado em termos de conversão de isoquercitrina e um valor calculado em termos de conversão de hesperetina-7-glucosídeo. Aqui, as composições nas quais cada valor calculado foi de 10% ou mais e não foram observados precipitados foram descritas como composições com uma solubilidade de 10% ou mais.

[00135] As proporções molares (%) nas composições de glicosídeos de flavonoides dos Exemplos 32-46 foram calculados de acordo com a fórmula a seguir a partir dos resultados analíticos sob as seguintes condições de HPLC (Simadzu). Os resultados são mostrados na Tabela 4. Aqui, cada pico de  $n = 0$  a  $n = 7$  nas Figuras 1 e 2 foi analisado por LC/MS (espectroscopia de massa por cromatografia líquida, SHIMADZU) para confirmar o número de glicosídeos.

Proporção molar (%) = Cada área de pico de composição dos glicosídeos de flavonoides  $\times 100$  / Área de pico total de composição dos glicosídeos de flavonoides

*Condições de HPLC: Exemplos 32 a 39*

Coluna: CAPCELL PAK C18, TAMANHO 4,6 mm  $\times$  250 mm (SHISEIDO)

Eluente: água/acetonitrila/ácido fosfórico = 799/200/1 (proporção em volume)

Deteccção: Análise absortiométrica no comprimento de onda de 351 nm

Vazão: 0,4 ml/min

Temperatura da coluna: 70°C

*Condições de HPLC: Exemplos 40 a 46*

Coluna: CAPCELL PAK C18, TAMANHO 4,6 mm  $\times$  250 mm (SHISEIDO)

Eluente: água/acetonitrila/ácido fosfórico = 849/150/1 (proporção em

volume)

Detecção: Análise absorvométrica no comprimento de onda de 280 nm

Vazão : 0,4 ml/min

Temperatura da coluna: 70°C

#### Avaliações de Sabores de Composições de Glicosídeos de Flavonoides

[00136] Os produtos liofilizados das composições dos glicosídeos de flavonoides dos Exemplos 32 a 46 foram adicionados a uma solução ácida de açúcar (pH de 3,1, Brix 10°), de modo que a concentração calculada em termos de isoquercitrina fosse de 0,05% (Exemplos 32 a 39) ou a concentração calculada em termos de hesperetina-7-glucosídeo fosse de 0,05% (Exemplos 40 a 46). Avaliações sensoriais (amargor, acidez e adstringência) foram realizadas por sete participantes do painel. De acordo com os critérios de avaliação a seguir, cada pontuação média foi calculada. Aqui, as comparações foram feitas ao definir as pontuações da avaliação para amargor, acidez e adstringência em uma solução ácida de açúcar que contém isoquercitrina a 0,05% preparada no Exemplo Comparativo 101 (solução imediatamente após preparação) como uma pontuação mais forte de 1. Além disso, uma vez que, na solução ácida de açúcar que contém isoquercitrina a 0,05% precipitados não foram observados por 30 minutos em temperatura ambiente após a preparação, as avaliações sensoriais foram realizadas durante este período. Os resultados são mostrados na Tabela 4.

#### Critérios de Avaliação de Amargor

- 1: Forte gosto de amargor
- 2: Gosto ligeiramente forte de amargor
- 3: Gosto de amargor
- 4: Leve gosto de amargor
- 5: Sem gosto de amargor

#### Critérios de Avaliação de Acidez

- 1: Forte gosto de acidez



2: Gosto ligeiramente forte de acidez

3: Gosto de acidez

4: Leve gosto de acidez

5: Sem gosto de acidez

Cr terios de Avalia o de Adstring ncia

1: Forte gosto adstringente

2: Gosto adstringente ligeiramente forte

3: Gosto adstringente

4: Leve gosto adstringente

5: Sem gosto adstringente

**Tabela 4**

	Representações numéricas de n nas fórmulas gerais (1) e (2)(Proporção molar (%))								Amargor	Acidez	Adstringência
	0	1	2	3	4	5	6	7 ou Mais			
Ex. 32	47,3	14,4	10,6	7,8	5,6	7,3	6,0	1,0	1,5	1,2	1,5
	47,3	32,8			19,9						
Ex. 33	9,0	27,7	23,2	20,1	6,8	5,2	8,0	0,0	1,8	1,8	1,9
	9,0	71,0			20,0						
Ex. 34	31,0	23,6	22,1	10,1	5,9	5,9	0,9	0,5	1,9	1,6	2,0
	31,0	55,8			13,2						
Ex. 35	22,0	21,0	23,0	13,0	8,5	5,0	3,1	4,4	1,9	2,5	1,8
	22,0	57,0			21,0						
Ex. 36.	27,0	18,0	13,0	7,0	12,7	13,2	4,9	4,2	4,2	4,1	3,9
	27,0	38,0			35,0						
Ex. 37.	18,2	20,0	18,0	18,0	8,1	6,9	6,7	4,1	2,0	2,1	2,2
	18,2	56,0			25,8						
Ex. 38.	20,9	14,7	12,8	11,1	8,8	7,3	6,1	18,2	4,8	4,5	3,9
	20,9	38,5			40,6						
Ex. 39.	16,2	14,7	13,9	12,1	9,1	7,9	6,7	19,3	4,0	4,9	4,8
	16,2	40,7			43,1						
Ex. 40.	19,5	16,2	13,8	10,9	9,5	7,0	5,5	17,6	4,1	4,0	4,1

	Representações numéricas de n nas fórmulas gerais (1) e (2)(Proporção molar (%))								Amargor	Acidez	Adstringência
	0	1	2	3	4	5	6	7 ou Mais			
	19,5	40,9			39,6						
Ex. 41	15,1	17,3	16,3	12,7	8,4	7,0	5,0	18,2	4,2	4,3	4,2
	15,1	46,3			38,6						
Ex. 42	8,0	25,0	20,0	14,8	7,5	5,9	4,7	14,1	2,3	2,5	2,5
	8,0	59,8			32,2						
Ex. 43	22,0	20,6	17,0	16,5	7,0	5,5	5,0	6,4	1,9	2,0	2,1
	22,0	54,1			23,9						
Ex. 44	35,0	21,3	18,1	12,6	4,3	3,0	2,7	3,0	1,9	2,1	1,8
	35,0	52,0			13,0						
Ex. 45	46,7	17,2	9,3	4,6	5,0	4,1	4,8	8,3	1,2	1,3	1,5
	46,7	31,1			22,2						
Ex. 46	13,4	29,8	28,2	16,7	2,2	1,5	2,2	6,0	1,8	1,9	1,8
	13,4	74,7			11,9						

[00137] Conforme é evidente a partir da Tabela 4, as composições de glicosídeos dos Exemplos 36, 38, 39, 40 e 41 nas quais o teor de glicosídeos que tem  $n = 0$  é de 10% em mol ou mais e 30% em mol ou menos, o teor de glicosídeos que tem  $n = 1$  a 3 é de 50% em mol ou menos e o teor de glicosídeos que tem  $n = 4$  ou mais é de 30% em mol ou mais nas fórmulas gerais (1) e (2) apresentam um amargor, acidez e adstringência significativamente reduzidos nas avaliações sensoriais com soluções ácidas de açúcar, de modo que as composições podem ser adequadamente usadas em aplicações de gêneros alimentícios. Aqui, uma vez que todas as composições dos glicosídeos dos Exemplos 32 a 46 têm excelentes solubilidades, estas composições podem ser adequadamente usadas em aplicações com sabor irrelevante, por exemplo, aplicações em cosméticos e assim por diante. Além disso, embora não mostrado nas tabelas, quanto às composições de glicosídeos de naringenina-7-glicosídeo obtidas usando as misturas líquidas de reação preparadas nos Exemplos 104 a 106, o amargor, a acidez e a adstringência foram significativamente reduzidos de acordo com as avaliações sensoriais para uma concentração de um valor calculado como 0,05% em termos da conversão de naringenina-7-glucosídeo em uma solução ácida de açúcar quando o teor de glicosídeos que tem  $n = 0$  é 10% em mol ou mais e 30% em mol ou menos, o teor de glicosídeos que tem  $n = 1$  a 3 é 50% em mol ou menos e o teor de glicosídeos que tem  $n = 4$  ou mais é 30% em mol ou mais.

Proporção Molar em Composições de Glicosídeos de Flavonoides (Ramnose/Flavonoides)

[00138] A proporção molar de uma concentração molar calculada após as medições do teor de ramnose das amostras 1 e 2 (uma curva de calibração foi traçada com ramnose (WAKO) sob as mesmas condições que a análise de sacarídeo por HPLC) para uma concentração molar calculada a partir de um valor calculado em termos de conversão de isoquercitrina e um valor calculado em termos de conversão de hesperetina-7-glucosídeo (ramnose/flavonoide) foi de 0,8 a 1,2.

### Avaliações dos Efeitos de Prevenção de Desvanecimento

[00139] Uma composição que contém um composto de inclusão de flavonoide do Exemplo 16 e uma composição de glicosídeos de flavonoides do Exemplo 39 foram adicionadas a uma solução ácida de açúcar que contém 0,05% de formulação de cor de repolho roxo (pH de 3,0) de modo a ter uma concentração de 0,005% calculada em termos de conversão de isoquercitrina. A mistura foi submetida a um tratamento por ultravioleta durante 4 horas e, em seguida, a porcentagem de cor residual foi comparada. Como um resultado, efeitos de prevenção de desvanecimento foram observados comparado com um produto sem aditivos. Os resultados são mostrados na Tabela 5.

**Tabela 5**

	Porcentagem Residual de Cor (%)
Exemplo 16	96
Exemplo 39	95
Produto sem aditivos	56

[00140] Conforme é evidente a partir da Tabela 5, foram observados efeitos de prevenção de desvanecimento da cor repolho vermelho na composição de inclusão de isoquercitrina- $\gamma$ -ciclodextrina que contém o composto e a composição de glicosídeos de isoquercitrina.

### Avaliações dos Efeitos de Prevenção da Deterioração do Sabor (Leite)

[00141] Cem mililitros de uma mistura líquida finalizada na reação do Exemplo 16 foram colocados em uma membrana de diálise (Spectra/Por CE, Dialysis Tube, MWCO 500-1000, fabricada pela Funakoshi), a diálise foi realizada em 10 L de água (trocada cinco vezes por água a 10°C) para remover a ramnose e a solução foi liofilizada para proporcionar 22 g de produtos secos. Os produtos secos obtidos e a composição dos glicosídeos de flavonoides do Exemplo 39 foram adicionados a um leite comercialmente disponível (leite integral a 3,5%, "Meiji Nyugyo", fabricado pela Meiji Co., Ltda.), de modo a obter uma

concentração de um valor calculado de 0,005% em termos da conversão de isoquercitrina em um frasco de vidro transparente de 100 ml. Os sabores após iluminação com uma lâmpada fluorescente (20.000 lx, 5 horas, 10°C) foram comparados como uma pontuação média de dez participantes, de acordo com os critérios de avaliação a seguir. Como um resultado, foram observados efeitos para evitar a deterioração do sabor. Os resultados são mostrados na Tabela 6.

#### Cr terios de Avalia o

- 1: Acentuadamente alterado em rela o a um produto n o iluminado
- 2: Consideravelmente alterado em rela o a um produto n o iluminado
- 3: Um pouco alterado em rela o a um produto n o iluminado
- 4: Muito levemente alterado em rela o a um produto n o iluminado
- 5: N o alterado em rela o a um produto n o iluminado

**Tabela 6**

	Efeitos de preven�o da deteriora�o do sabor (leite)
Exemplo 16	3,8
Exemplo 39	3,9
Produto sem aditivos	2,2

[00142] Conforme   evidente a partir da Tabela 6, foram observados os efeitos de preven o da degrada o do sabor do leite com um composto de inclus o de isoquercitrina- -ciclodextrina e uma composi o de glicos deos isoquercitrina.

#### Avalia es dos Efeitos de Preven o da Deteriora o do Sabor (Geleia)

[00143] A geleia de toranja, um produto sem aditivos, foi preparada usando 0,5% de suco de fruta (1/6), 3% de gelatina, 1% de suco de toranja, 6% de maltitol e 0,025% de formula o de corante amarelo de c rtamo como mat rias-primas. Cem mililitros da mistura l quida finalizada na rea o do Exemplo 22 ou 28 foram colocados em uma membrana de di lise (Spectra/Por CE, Dialysis Tube, MWCO 500-1000, fabricado pela Funakoshi). Di lise foi realizada em 10 L de

água (trocado cinco vezes por água a 10°C) para remover a ramnose e a solução foi liofilizada para proporcionar 12 g de produtos secos do Exemplo 22 e 16 g de produtos secos do Exemplo 28. Cada um dos produtos secos obtidos e a composição de glicosídeos de flavonoides do Exemplo 40 foram adicionados à geleia de toranja, o produto sem aditivos, de modo a ter uma concentração de um valor calculado como 0,005% em termos de conversão de hesperetina-7-glucosídeo para proporcionar uma geleia de toranja que é um produto que inclui aditivo, respectivamente. Depois disso, a geleia foi aquecida para 93°C, o produto aquecido foi enchido em uma garrafa de vidro transparente e este conteúdo foi hermeticamente selado na garrafa e a garrafa foi, então, resfriada e armazenada durante um mês em uma sala iluminada com uma lâmpada fluorescente normal em temperatura ambiente. Posteriormente, o sabor foi comparado em pontuações médias por dez participantes, de acordo com os critérios de avaliação a seguir. Como um resultado, foram observados efeitos de prevenção da deterioração do sabor em cada produto, incluindo o aditivo. Os resultados são mostrados na Tabela 7.

#### Cr terios de Avalia o

- 1: Acentuadamente alterado em rela o a um produto n o iluminado
- 2: Consideravelmente alterado em rela o a um produto n o iluminado
- 3: Um pouco alterado em rela o a um produto n o iluminado
- 4: Muito levemente alterado em rela o a um produto n o iluminado
- 5: N o alterado em rela o a um produto n o iluminado

**Tabela 7**

	Efeitos de preven�o da deteriora�o do sabor (geleia)
Exemplo 22	4,1
Exemplo 28	4,0
Exemplo 40	4,2
Produto sem aditivos	1,9

[00144] Conforme   evidente a partir da Tabela 7, os efeitos de preven o da degrada o do sabor em geleia de toranja foram observados

para um composto de inclusão de hesperitina-7-glucosídeo- $\beta$ -ciclode-xtrina, um composto de inclusão de hesperitina-7-glucosídeo- $\gamma$ -ciclodex-trina e uma composição de glicosídeos de hesperetina-7-glicosídeo.

Avaliação de Estabilidade ao Armazenamento (Solução Ácida de Açúcar)

[00145] A isoquercitrina preparada no Exemplo Comparativo 101, a composição que contém um composto de inclusão de flavonoide do Exemplo 16 e a composição de glicosídeos de flavonoides do Exemplo 39 foram dissolvidas em uma solução ácida de açúcar com um pH de 3 composta pelas composições a seguir, de modo a ter uma concen-tração calculada como 0,03% em termos de conversão de isoquercitri-na e a solução foi submetida a enchimento com envasamento a quen-te (*hot-pack*) em uma garrafa de vidro de 100 ml (93°C). Após resfria-mento ao ar, as soluções preparadas foram deixadas em repouso du-rante 4 meses sob as condições de 4°C, 25°C e 40°C, respectivamen-te, e a presença ou ausência dos precipitados foi observada visual-mente. As soluções transparentes nas quais os precipitados não foram observados foram avaliadas como o e as soluções nas quais os preci-pitados foram observados foram avaliadas como x. Os resultados são mostrados na Tabela 8.

Composição da solução ácida de açúcar

	(% em massa)
1. Açúcar	10
2. Ácido Cítrico (Cristalino)	0,08
3. Citrato trissódico	pHajustado(pH de 3)
4. Água	Equilíbrio

**Tabela 8**

	4°C	25°C	40°C
Isoquercitrina	x	x	x
Exemplo 16	o	o	o
Exemplo 39	o	o	o



[00146] Conforme mostrado na Tabela 8, quando isoquercitrina foi adicionada à solução ácida de açúcar, precipitados foram observados imediatamente após armazenamento em todas as faixas de refrigeração (4°C), temperatura ambiente (25°C) e 40°C. No entanto, no caso no qual o composto de inclusão de isoquercitrina- $\gamma$ -ciclodextrina e a composição dos glicosídeos de isoquercitrina foram adicionados, precipitados não foram observados, mesmo quando as soluções foram deixadas em repouso durante 4 meses, e precipitados ainda não foram observados mesmo em um armazenamento a longo prazo de 5 meses.

#### Avaliação de Estabilidade ao Armazenamento (Chá Verde)

[00147] Hesperidina (fabricada pela Hamari Chemicals. Ltda.), hesperetina-7-glicosídeo (preparada a seguir), um composto de inclusão de flavonoide do Exemplo 22 ou uma composição de glicosídeos de flavonoides do Exemplo 40 foi adicionada a um chá verde comercialmente disponível ("*Oi Ocha*", fabricado pela ITO EN, LTDA.), de modo a obter uma concentração calculada de 0,03% em termos de conversão de hesperetina-7-glicosídeo. A mistura foi deixada repousar durante 7 dias a 4°C e 25°C e a presença ou ausência de precipitados foi, então, observada visualmente. As soluções transparentes nas quais os precipitados não foram observados foram avaliadas como  $\circ$  e as soluções nas quais os precipitados foram observados foram avaliadas como  $\times$ . Os resultados são mostrados na Tabela 9.

[00148] Sete gramas de hesperidina (fabricada pela Hamari Chemicals., Ltda.) foi adicionada a 100 L de uma solução aquosa e a solução foi ajustada para 70°C e um pH de 4,5. Em seguida, foram adicionados 0,5 g de naringinase (Amano Enzyme Inc. 155 u/g) enquanto se agitava, e a solução foi recuperada e seca para proporcionar 4,2 g de hesperetina-7-glicosídeo com um teor de 96% ou mais. A identificação como sendo hesperetina-7-glicosídeo e o teor da mesma foram anali-

sados por RMN e HPLC da mesma maneira conforme mencionado acima.

**Tabela 9**

	4°C	25°C
Hesperidina	×	×
Hesperetina-7-glucosídeo	×	×
Exemplo 22	○	○
Exemplo 40	○	○

[00149] Conforme mostrado na Tabela 9, quando a hesperidina ou hesperetina-7-glucosídeo foi adicionada a um chá verde, precipitados foram observados imediatamente após armazenamento, tanto sob refrigeração (4°C) quanto em temperatura ambiente (25°C). No entanto, no caso no qual a composição que contém o composto de inclusão de hesperetina-7-glucosídeo e a composição dos glicosídeos de hesperetina-7-glucosídeo foram adicionadas, precipitados não foram observados mesmo quando o chá verde foi deixado em repouso durante 7 dias.

#### Avaliação de Estabilidade ao Armazenamento (Bebida de Limão)

[00150] Naringina (fabricada pela SIGMA), naringenina-7-glucosídeo (preparada abaixo) ou uma composição que contém um composto de inclusão de flavonoide do Exemplo 109 foi adicionada a uma bebida de limão comercialmente disponível (C1000 Lemon Water, fabricada pela HOUSE WELLNESS FOODS CORPORATION), de modo a obter uma concentração calculada de 0,3% em termos de conversão de naringenina-7-glucosídeo. A bebida foi deixada repousar durante 1 mês a 4°C ou 25°C e a presença ou ausência dos precipitados foi, então, visualmente observada. As soluções transparentes nas quais precipitados não foram observados foram avaliadas como ○ e as soluções nas quais precipitados foram observados foram avaliadas como ×. Os resultados são mostrados na Tabela 9-2.

[00151] Após término da reação de acordo com o Exemplo Comparativo 102, precipitados que foram previamente deixados em repouso em temperatura ambiente foram recuperados, lavados com água, recristalizados e secos para proporcionar 13 g de naringenina-7-glucosídeo que tem um teor de 95% ou mais. A identificação do produto como um reagente de naringenina-7-glucosídeo (Wako) foi executada por HPLC e seu teor foi analisado.

**Tabela 9-2**

	4°C	25°C
Naringina	×	×
Naringenina-7-glucosídeo	×	×
Exemplo 109	○	○

[00152] Conforme mostrado na Tabela 9-2, em que naringina ou naringenina-7-glucosídeo foi adicionado a uma bebida de limão, precipitados foram observados tanto em armazenamento sob refrigeração (4°C) como em temperatura ambiente (25°C). Contudo, em um caso no qual a composição que contém o composto de inclusão de naringenina-7-glucosídeo foi adicionada, precipitados não foram observados, mesmo quando a bebida foi deixada em repouso durante 1 mês.

#### Avaliação de Biodisponibilidade

[00153] Ratos Wister de nove semanas de idade (machos) receberam MF (Oriental Yeast Co., Ltda.) e foram criados por 7 dias e os ratos foram, então, submetidos a jejum no dia antes da administração de uma substância de teste. Posteriormente, 100 µmol/kg (calculado como IQC) de um produto seco do Exemplo 16 preparado na avaliação dos efeitos de prevenção da deterioração do sabor, uma suspensão de rutina (Alps Pharmaceutical Ind., Co., Ltda., 100 µmol/kg (calculado como IQC)), 1.000 µmol/kg (calculado como HPT-7G) do produto seco do Exemplo 22 preparado nas avaliações dos efeitos de prevenção da deterioração do sabor e uma suspensão de hesperidina (Hamari Che-

micals., Ltda., 1.000  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  (calculado como HPT-7G)) foram administrados por via oral aos ratos em uma dose única (administrado por via oral através de gavagem,  $n = 2$ ). A coleta de sangue em tubos heparinizados foi realizada a partir de veias da cauda dos ratos 30 minutos, 1 hora e 3 horas após administração e o sangue foi centrifugado para obter plasma. Na amostra de soros coletados, as quantidades de derivados de quercetina foram medidas de acordo com um método de Makino *et al.* (*Biol. Pharm. Bull.*, **32** (12) 2034, 2009) e as quantidades de derivados de hesperetina foram medidas de acordo com um método de Yamada *et al.* (*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70** (6), 1386, 2006), e a análise foi feita aplicando a amostra à cromatografia líquida de alta eficiência (SHIMADZU) e usando um detector de matriz de fotodiodo (SPD-M30A, SHIMADZU). Os resultados são mostrados nas Tabelas 10 e 11. A Tabela 10 mostra as concentrações de quercetina e derivados de quercetina (isso-ramnetina, tamarixetina) ( $\mu\text{M}$ ) no tempo de 0 a 3 horas e a área sob a curva da concentração sanguínea em função do tempo (AUC) de uma quantidade total ( $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ ). Além disso, uma vez que o derivado de hesperetina não foi detectado, a Tabela 11 mostrou uma concentração de hesperetina ( $\mu\text{M}$ ) no tempo de 0 a 3 horas e a área sob a curva (AUC) da concentração sanguínea em função do tempo ( $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ ).

**Tabela 10**

	Tempo de coleta de sangue	Suspensão de rutina	Exemplo 16
Quercetina ( $\mu\text{M}$ )	0,0	0,0	0,0
	0,5	0,0	9,3
	1	0,004	10,3
	3	0,0	6,9
Isso-ramnetina ( $\mu\text{M}$ )	0,0	0,0	0,0
	0,5	0,0	0,3
	1	0,004	0,3
	3	0,0	0,2

	Tempo de coleta de sangue	Suspensão de rutina	Exemplo 16
Tamarixetina ( $\mu\text{M}$ )	0,0	0,0	0,0
	0,5	0,0	2,1
	1	0,01	3,6
	3	0,08	4,2
Total ( $\mu\text{M}$ )	0,0	0,0	0,0
	0,5	0,0	11,6
	1	0,018	14,2
	3	0,08	11,3
AUC ( $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ )	Total	0,1	34,9

Tabela 11

	Tempo de coleta de sangue	Suspensão de Hesperidina	Exemplo 22
Hesperetina ( $\mu\text{M}$ )	0,0	0,0	0,0
	0,5	0,003	113,5
	1	0,064	130,2
	3	0,0	52,6
AUC ( $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ )	Total	0,082	272,0

[00154] Conforme mostrado nas Tabelas 10 e 11, pode ser visto, na comparação da AUC de 0 a 3 horas, que o composto de inclusão de isoquercitrina- $\gamma$ -ciclodextrina ou o composto de inclusão hesperitina-7-glucosídeo- $\beta$ -ciclodextrina foi eficientemente absorvido pelos ratos comparado com a rutina ou hesperidina. Além disso, embora não mostrado nas Tabelas, a capacidade de biodisponibilidade de 100  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  (calculada como IQC) da composição dos glicosídeos de isoquercitrina do Exemplo 39 foi quase a mesma que aquela do Exemplo 16 e a capacidade de biodisponibilidade de 1.000  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  (calculado como HPT-7G) da composição de glicosídeos de hesperetina-7-glucosídeo do Exemplo 40 foi quase a mesma que aquela do Exemplo 22.

### Efeitos de Aprimoramento da Solubilidade do Flavonoide Pouco Solúvel

#### Exemplos 110 a 113

[00155] Um composto de inclusão de rutina (RTN) e isoquercitrina com  $\gamma$ -ciclodextrina (IQC-rCD) foi dissolvido em uma solução ácida de açúcar (pH de 3,1, Brix de 10°) nas quantidades dos componentes listados na Tabela 12, e a solução foi submetida a um envasamento a quente para encher um frasco de vidro de 100 ml. A solução preparada foi resfriada ao ar e submetida a armazenamento sob refrigeração (4°C, 6 meses) e a presença ou ausência de precipitados foi, então, visualmente observada. Os resultados são mostrados na Tabela 12.

#### Exemplos Comparativos 103 a 106 e Exemplo de Referência

[00156] Os mesmos procedimentos dos Exemplos 110 a 113 foram realizados na preparação, resfriamento ao ar e armazenamento sob refrigeração, exceto que a rutina (RTN) e a isoquercitrina (IQC) foram dissolvidas em uma solução ácida de açúcar em quantidades dos componentes listados na Tabela 13, e a presença ou ausência de precipitados foi observada visualmente. Os resultados são mostrados na Tabela 13.

[00157] Nas Tabelas 12 e 13, a IQC/RTN (proporção molar) foi obtida ao analisar por HPLC (SHIMADZU, as mesmas condições para a taxa de conversão) usando 1 ml de uma solução ácida de açúcar imediatamente após dissolução dos componentes da preparação como uma amostra de medição e, em seguida, expressando uma proporção aérea (área de pico de isoquercitrina/área de pico de rutina) como uma proporção molar.

**Tabela 12**

	(41) RTN (% em massa)	(42) IQC- $\gamma$ CD (% em massa)	(43) IQC (% em massa)	(44) $\gamma$ CD (% em massa)	(45) Solubilidade	(46) IQC/RTN (pro- porção molar)
Ex. 110	0,05	0,02	0,005	0,014	-	0,13
Ex. 111	0,05	0,04	0,01	0,028	-	0,26
Ex. 112	0,05	0,08	0,02	0,056	-	0,53
Ex. 113	0,05	0,09	0,025	0,070	-	0,66

**Tabela 13**

	(41) RTN (% em massa)	(42) IQC- $\gamma$ CD (% em massa)	(43) IQC (% em massa)	(44) $\gamma$ CD (% em massa)	(45) Solubilidade	(46) IQC/RTN (proporção molar)
Ex. Comp. 103	0,05	0,0	0,005	0,0	++	0,13
Ex. Comp. 104	0,05	0,0	0,01	0,0	++	0,26
Ex. Comp. 105	0,05	0,0	0,02	0,0	++	0,53
Ex. Comp. 106	0,05	0,0	0,025	0,0	++	0,66
Ex. Ref.	0,05	0,0	0,0	0,0	+++	0,003

Notas das Tabelas 12 e 13

(41) Concentração de rutina em uma solução ácida de açúcar (% em massa)

(42) Concentração do composto de inclusão de isoquercitrina- $\gamma$ -ciclodextrina em uma solução ácida de açúcar (% em massa)

(43) Concentração de isoquercitrina em uma solução ácida de açúcar (% em massa)

(44) Concentração de  $\gamma$ -ciclodextrina em uma solução ácida de açúcar (% em massa)

(45) Solubilidade:

Precipitados não foram observados: -

A quantidade de precipitados era pequena: +

A quantidade de precipitados era levemente grande: ++

A quantidade de precipitados era grande: +++

(46) Isoquercitrina/rutina em uma solução ácida de açúcar (proporção molar)

[00158] Conforme mostrado nas Tabelas 12 e 13, nos Exemplos 110 a 113, aos quais foi adicionado o composto de inclusão de isoquercitrina- $\gamma$ -ciclodextrina, a solubilidade da rutina foi aprimorada e precipitados não foram observados, especialmente quando a proporção molar de isoquercitrina e rutina (isoquercitrina/rutina) estava dentro de uma faixa a partir de 0,1 a 0,7. Os mesmos resultados que estes foram também mostrados nos produtos liofilizados dos compostos de inclusão de flavonoides dos Exemplos 10, 13 e 14 (produtos nos quais a ramnose foi removida por meio de diálise) e no produto liofilizado da composição que contém o composto de inclusão de flavonoide que contém ramnose. Por outro lado, conforme mostrado na Tabela 13, nos produtos aos quais foi adicionada apenas isoquercitrina, precipitados foram observados em todos os casos.

[00159] Além disso, nas Tabelas 12 e 13, também foram obtidos os mesmos resultados para a isoquercitrina e isoquercitrina- $\beta$ -ciclodextrina (produtos liofilizados dos Exemplos 1 a 7) ou hesperidina e hesperidina-7-glucosídeo- $\beta$ -ciclodextrina (produtos liofilizados dos Exemplos 18 a 23), em vez de rutina ou hesperetina-7-glucosídeo- $\gamma$ -ciclodextrina (produtos liofilizados dos Exemplos 27 a 31).



Avaliação de Estabilidade a Longo Prazo e Adstringência do Composto de Inclusão de Isoquercitrina- $\gamma$ -Ciclodextrina

Exemplos 114 a 117

[00160] As soluções foram preparadas da mesma maneira conforme os Exemplos 110 a 113, exceto que as quantidades de componentes listadas na Tabela 14 foram usadas. Imediatamente após resfriamento ao ar, foram realizadas avaliações sensoriais quanto à adstringência. Além disso, soluções com as mesmas quantidades de componentes foram preparadas separadamente e submetidas a armazenamento sob refrigeração (4°C, 12 meses) e a presença ou ausência de precipitados foi, então, visualmente observada. Os resultados são mostrados na Tabela 14.

Exemplos Comparativos 107 a 110

[00161] Soluções foram preparadas da mesma maneira que os Exemplos 103 a 106, exceto que as quantidades de componentes listadas na Tabela 15 foram usadas. Imediatamente após resfriamento ao ar, foram realizadas avaliações sensoriais quanto à adstringência. Além disso, soluções com as mesmas quantidades de componentes foram preparadas separadamente, as soluções foram armazenadas sob refrigeração (4°C, 12 meses). Depois disso, a presença ou ausência de precipitados foi observada visualmente. Os resultados são mostrados na Tabela 15.

[00162] Nas Tabelas 14 e 15, RTN/IQC (proporção molar) foi obtida por meio de análise HPLC (Shimadzu, as mesmas condições conforme aquelas para a taxa de conversão) usando 1 ml de uma solução ácida de açúcar imediatamente após dissolução dos componentes da preparação como uma amostra de medição e, em seguida, expressando uma proporção aérea (área de pico de rutina/área de pico de isoquercitrina) como uma proporção molar.

**Tabela 14**

	(51) IQC- $\gamma$ CD (% em massa)	(52) IQC (% em massa)	(53) $\gamma$ CD (% em massa)	(54) RTN (% em massa)	(55) Solubilidade	(56) RTN/IQC (proporção molar)	(57) Adstringência
Ex. 114	0,38	0,1	0,28	0,0004	-	0,003	1,2
Ex. 115	0,38	0,1	0,28	0,001	-	0,01	1,3
Ex. 116	0,38	0,1	0,28	0,005	-	0,04	1,3
Ex. 117	0,38	0,1	0,28	0,01	-	0,08	1,3

**Tabela 15**

	(51) IQC- $\gamma$ CD (% em massa)	(52) IQC (% em massa)	(53) $\gamma$ CD (% em massa)	(54) RTN (% em massa)	(55) Solubilidade	(56) RTN/IQC (proporção molar)	(57) Adstringência
Ex. Comp. 107	0,0	0,1	0,0	0,0004	+++	0,003	2,7
Ex. Comp. 108	0,0	0,1	0,0	0,001	++	0,01	2,8
Ex. Comp. 109	0,0	0,1	0,0	0,005	++	0,04	2,8
Ex. Comp. 110	0,0	0,1	0,0	0,01	++	0,08	3,0

Notas das Tabelas 14 e 15

(51) Concentração do composto de inclusão de isoquercitrina- $\gamma$ -ciclodextrina em uma solução ácida de açúcar (% em massa)

(52) Concentração de isoquercitrina em uma solução ácida de açúcar (% em massa)

(53) Concentração de  $\gamma$ -ciclodextrina em uma solução ácida de açúcar (% em massa)

(54) Concentração de rutina em uma solução ácida de açúcar (% em massa)

(55) Solubilidade:

Precipitados não foram observados: -

A quantidade de precipitados era pequena: +

A quantidade de precipitados era um pouco grande: ++

A quantidade de precipitados era grande: +++

(56) Rutina/isoquercitrina em uma solução ácida de açúcar (proporção molar)

[00163] Imediatamente após a preparação e o resfriamento ao ar de uma solução ácida de açúcar, dez membros do painel classificaram uma amostra na qual a adstringência foi mais fortemente provada comparado com a solução ácida de açúcar sem aditivos como 3 pontos e seguido por 2 e 1 ponto, e uma média dos mesmos foi coletada.

[00164] Aqui, uma vez que precipitados não foram observados após a preparação e resfriamento ao ar dos Exemplos Comparativos 107 a 110 durante 30 minutos em temperatura ambiente, foram realizadas avaliações sensoriais durante este tempo.

[00165] Conforme mostrado na Tabela 14, foi confirmado que, mesmo quando rutina estava contida em uma quantidade especificada de uma composição que contém um composto de inclusão de isoquercitrina e  $\gamma$ -ciclodextrina obtido no método de produção da presente invenção, não havia desvantagens quanto à estabilidade a longo prazo do composto de inclusão. Além disso, foi confirmado que a adstringência era fraca, de modo que as influências sobre os sabores, quando adicionados aos alimentos, eram pequenas. Quando a RTN/IQC (pro-

porção molar) estava dentro de uma faixa de 0,08 ou menos (Exemplos 114 a 117), a adstringência era particularmente fraca. Os mesmos resultados também são mostrados nos produtos liofilizados dos compostos de inclusão de flavonoides dos Exemplos 10, 13 e 14 (nos quais a ramnose foi removida por meio de diálise) e nos produtos liofilizados de uma composição que contém um composto de inclusão de flavonoide que contém ramnose. Por outro lado, conforme mostrado na Tabela 15, em uma composição que contém isoquercitrina, quando a composição continha rutina, precipitados foram observados em todas as composições e a adstringência também era forte.

[00166] Além disso, nas Tabelas 14 e 15, os mesmos resultados também foram obtidos para a isoquercitrina e isoquercitrina- $\beta$ -ciclodextrina (produtos liofilizados dos Exemplos 1 a 7), hesperidina e hesperidina-7-glucosídeo- $\beta$ -ciclodextrina (produtos liofilizados dos Exemplos 18 a 23), em vez de rutina ou hesperetina-7-glucosídeo- $\gamma$ -ciclodextrina (produtos liofilizados dos Exemplos 27 a 31).

[00167] Os detalhes dos componentes usados nos Exemplos 110 a 117, Exemplos Comparativos 103 a 110 e Exemplo de Referência são mostrados abaixo.

[00168] RTN: Produto dissolvido a quente de 90 g em etanol a 99,5% em volume e 10 g de rutina (produto de preparação: proporção molar de isoquercitrina/rutina sendo de 0,3/99,7)

[00169] IQC-rCD: Produto liofilizado do Exemplo 16 (produto do qual a ramnose foi removida por meio de diálise (proporção molar de rutina/isoquercitrina sendo de 0,3/99,7))

[00170] IQC: Produto termicamente dissolvido de 18 g em etanol a 99,5% em volume e 2 g de isoquercitrina (produto de preparação: proporção molar de rutina/isoquercitrina sendo de 0,3/99,7)

Exemplos de Formulação de Composição que Contém um Composto de Inclusão de Flavonoide e Composição de Glicosídeos de Flavonoides

Exemplo de Formulação 1: Bebida de Toranja

[00171] Com o objetivo de impedir a deterioração do sabor, foi preparada uma bebida que contém um produto seco de uma composição que contém o composto de inclusão de isoquercitrina- $\gamma$ -ciclodextrina do Exemplo 16. O presente produto pode ser adequadamente usado como bebida.

Componente	% em massa
Suco de Toranja Concentrado	5,0
Xarope de glucose-frutose	0,9
Maltitol	2,0
Acidulante	0,3
Vitamina C	0,02
Flavorizantes	0,1
Produto seco do Exemplo 16	0,02
Água	Equilíbrio
Total	100

Exemplo de Formulação 2: Geleia

[00172] Com o objetivo de impedir a deterioração do sabor, foi preparada uma geleia que contém um produto seco de uma composição que contém o composto de inclusão de hesperetina-7-glucosídeo- $\beta$ -ciclodextrina do Exemplo 22. O presente produto pode ser adequadamente usado como alimento (geleia).

Componente	% em massa
Açúcar	10,0
Suco de Limão Concentrado	8,5
Preparação de <i>Gardenia Yellow</i>	0,004
Acidulante	1,0

Agente Gelificante	1,5
Vitamina C	0,02
Flavorizantes	0,2
Produto seco do Exemplo 22	0,04
Água	Equilíbrio
Total	100

#### Exemplo de Formulação 3: Cosméticos

[00173] Com o objetivo de melhorar a opacidade da pele e o inchaço relacionado ao edema, foram preparados cosméticos que contêm um produto seco de uma composição de glicosídeos de hesperetina-7-glicosídeo do Exemplo 40. O presente produto pode ser adequadamente usado como um cosmético para a pele.

Componente	% em massa
Glicerol	5,0
Propileno glicol	4,0
Álcool oleílico	0,1
Tensoativo	2,0
Álcool etílico	10,0
Perfume	0,1
Produto seco do Exemplo 40	0,26
Água purificada	Equilíbrio
Total	100

#### Exemplo de Formulação 4: Comprimido

[00174] Com o objetivo de moderar a temperatura corporal, foi preparado um comprimido que contém um produto seco de uma composição que contém o composto de inclusão de hesperetina-7-glucosídeo- $\beta$ -ciclodextrina do Exemplo 22. O presente produto pode ser adequadamente usado como um alimento saudável.

Componente	% em massa
------------	------------

Maltitol	69,0
Trealose	12,9
Acidulante	2,5
Estearato de cálcio	0,5
Vitamina C	0,02
Flavorizantes	0,08
Produto seco do Exemplo 22	15,0
Total	100

#### Exemplo de Formulação 5: Bebida de Café

[00175] Com o objetivo de reduzir a gordura corporal, foi preparada uma bebida de café que contém um produto seco de uma composição de glicosídeos de isoquercitrina do Exemplo 39. O presente produto pode ser usado adequadamente como alimento para uso específico em saúde.

Componente	% em massa
Extrato de café	32,6
Açúcar	6,0
Flavorizantes	0,06
Produto seco do Exemplo 39	0,06
Água	Equilíbrio
Total	100

#### Exemplo de Formulação 6: Bebida de Chá Preto

[00176] Com o objetivo de reduzir a gordura neutra, foi preparada uma bebida de chá preto que contém um produto seco de uma composição de glicosídeos de hesperetina-7-glucosídeo do Exemplo 40. O presente produto pode ser usado adequadamente como alimentos com função específica.

Componente	% em massa
Extrato de chá preto	18,6
Hidrogeno carbonato de sódio	0,002

Sucralose	0,003
Vitamina C	0,03
Flavorizantes	0,1
Produto seco do Exemplo 40	0,06
Água	Equilíbrio
Total	100

#### Exemplo de Formulação 7: Restaurador Capilar

[00177] Com o objetivo de melhorar a saúde do couro cabeludo, foi preparado um restaurador capilar que contém um produto seco de uma composição que contém o composto de inclusão de hesperetina-7-glucosídeo- $\beta$ -ciclodextrina do Exemplo 22.

Componente	% em massa
Álcool etílico	60,0
Extrato de <i>Swertia japonica</i>	5,0
Acetato de tocoferol	0,2
Éter Pantenil etílico	0,2
Propileno glicol	5,0
Conservante	0,1
Perfume	0,2
Produto seco do Exemplo 22	0,03
Água purificada	Equilíbrio
Total	100

#### Exemplo de Formulação 8: Xampu Capilar

[00178] Com o objetivo de prevenir a inflamação, foi preparado um xampu capilar que contém um produto seco de uma composição que contém o composto de inclusão de hesperetina-7-glucosídeo- $\gamma$ -ciclodextrina do Exemplo 27.

Componente	% em massa
Sulfato de Éter Laurílico de Polioxietileno de Sódio (2)	9,0
Lauril Sulfato de Sódio	4,0
Cocamidopropil Betaína	3,0



Metil Polissiloxano de elevada polimerização	2,0
Metil Polissiloxano	1,0
Ácido graxo de óleo de coco	1,0
Monoetanolamida	1,0
Propileno glicol	2,0
Diestearato de etileno glicol	2,0
Conservante	0,1
Perfume	0,1
Produto seco do Exemplo 27	0,03
Água	Equilíbrio
Total	100

#### Exemplo de Formulação 9: Comprimido Dietético

[00179] Com o objetivo de uma dieta, foi preparado um comprimido que contém um produto seco de uma composição que contém o composto de inclusão de naringenina-7-glucosídeo- $\beta$ -ciclodextrina do Exemplo 109. O presente produto pode ser adequadamente usado como um alimento saudável.

Componente	% em massa
Maltitol	64,0
Trealose	12,9
Acidulante	2,5
Estearato de cálcio	0,5
Vitamina C	0,02
Flavorizantes	0,08
Produto seco do Exemplo 109	20,0
Total	100

#### APLICABILIDADE INDUSTRIAL

[00180] De acordo com o método de produção da presente invenção, um composto de inclusão de flavonoide e uma composição de glicosídeos de flavonoides que tem uma excelente solubilidade em água podem ser produzidos de forma eficiente, de modo que o composto e a composição possam ser adequadamente usados nos cam-

pos de medicamento, produtos alimentícios, alimentos saudáveis, alimentos para uso específico em saúde, cosméticos e assim por diante.

## REIVINDICAÇÕES

1. Composição que contém um composto de inclusão de flavonoide que compreende um composto de inclusão de flavonoides e uma ramnose, caracterizada pelo fato de que o composto de inclusão de flavonoides é obtido por meio de um método de produção, em que o método compreende uma etapa de eliminação que compreende tratar um flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo com uma enzima que tem uma atividade de ramnosidase na presença de uma ciclodextrina para eliminar uma ramnose, em que a proporção molar de um flavonoide no composto de inclusão de flavonoides para ramnose (ramnose/flavonoide) é a partir de 0,8 a 1,2 e em que a ciclodextrina é um ou mais membros selecionados a partir do grupo que consiste em  $\beta$ -ciclodextrina,  $\beta$ -ciclodextrina ramificada e  $\gamma$ -ciclodextrina.

2. Composição que contém um composto de inclusão de flavonoides, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo é um ou mais membros selecionados a partir do grupo que consiste em rutina, hesperidina, narirutina, naringina, diosmina, eriocitrina, mirricitrina, neoesperidina, luteolina-7-rutinosídeo, delphinidina-3-rutinosídeo, cianidina-3-rutinosídeo, isoramnetina-3-rutinosídeo, kaempferol-3-rutinosídeo, apigenina-7-rutinosídeo e acacetina-7-rutinosídeo.

3. Composição que contém um composto de inclusão de flavonoides, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que a ciclodextrina está presente em a proporção de 0,01 mol ou mais com base em 1 mol do flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo.

4. Composição que contém um composto de inclusão de flavonoides, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que a etapa de eliminação é realizada em um meio aquoso que tem um pH a partir de 3 a 7.

5. Composição que contém um composto de inclusão de flavonoides, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que o composto de inclusão de flavonoides compreende o flavonoide pouco solúvel sem uma estrutura de ramnosídeo incluído em uma ciclodextrina e em que a proporção molar do flavonoide pouco solúvel sem uma estrutura de ramnosídeo e a ciclodextrina (ciclodextrina/flavonoide) é a partir de 1,0 a 3,0.

6. Composição que contém um composto de inclusão de flavonoides que compreende um composto de inclusão de flavonoides, um flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo e uma ramnose, caracterizada pelo fato de que o composto de inclusão de flavonoides compreende isoquercitrina com inclusão em  $\gamma$ -ciclodextrina e em que a proporção molar de isoquercitrina e  $\gamma$ -ciclodextrina ( $\gamma$ -ciclodextrina/isoquercitrina) é a partir de 0,9 a 1,8, a solubilidade em água da isoquercitrina é 2% ou mais, a proporção molar de um flavonoide no composto de inclusão de flavonoides e o flavonoide pouco solúvel (flavonoide pouco solúvel/flavonoide no composto de inclusão) é a partir de 0,001 a 0,1 e a proporção molar de um flavonoide no composto de inclusão de flavonoides e a ramnose (ramnose/flavonoide) é a partir de 0,8 a 1,2.

7. Composição que contém um composto de inclusão de flavonoides que compreende um composto de inclusão de flavonoides, um flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo e ramnose, caracterizada pelo fato de que o composto de inclusão de flavonoides compreende isoquercitrina com inclusão em  $\gamma$ -ciclodextrina, em que a proporção molar de isoquercitrina e  $\gamma$ -ciclodextrina ( $\gamma$ -ciclodextrina/isoquercitrina) é a partir de 0,9 a 4,0, a solubilidade em água da isoquercitrina é de 2,5% ou mais, a proporção molar de um flavonoide no composto de inclusão de flavonoides e o flavonoide pouco solúvel (flavonoide pouco solúvel/flavonoide no composto de inclusão) é a partir de 0,001 a

0,1 e a proporção molar de um flavonoide no composto de inclusão de flavonoides e a ramnose (ramnose/flavonoide) é a partir de 0,8 a 1,2.

8. Composição que contém um composto de inclusão de flavonoides, de acordo com a reivindicação 6 ou 7, caracterizada pelo fato de que a proporção molar de isoquercitrina e  $\gamma$ -ciclodextrina ( $\gamma$ -ciclodextrina/isoquercitrina) é a partir de 1,0 a 1,8 e em que a doçura é reduzida.

9. Composição que contém um composto de inclusão de flavonoides que compreende um composto de inclusão de flavonoides, um flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo e ramnose, caracterizada pelo fato de que o composto de inclusão de flavonoides compreende isoquercitrina incluída em  $\beta$ -ciclodextrina, em que a proporção molar de isoquercitrina e  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -ciclodextrina/isoquercitrina) é a partir de 1,0 a 3,0, a solubilidade em água da isoquercitrina é a partir de 0,1% ou mais, a proporção molar de flavonoide no composto de inclusão de flavonoides e flavonoide pouco solúvel (flavonoide pouco solúvel/flavonoide no composto de inclusão) é a partir de 0,001 a 0,1 e a proporção molar de um flavonoide no composto de inclusão de flavonoides e ramnose (ramnose/flavonoide) é a partir de 0,8 a 1,2.

10. Composição que contém um composto de inclusão de flavonoides que compreende um composto de inclusão de flavonoides, um flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura ramnosídeo e uma ramnose, caracterizada pelo fato de que o composto de inclusão de flavonoides compreende hesperetina-7-glucosídeo incluído em uma ciclodextrina, em que a proporção molar da hesperetina-7-glucosídeo e da ciclodextrina (ciclodextrina/hesperetina-7-glucosídeo) é a partir de 1,0 a 3,0, a solubilidade em água da hesperetina-7-glucosídeo é a partir de 0,01% ou mais, a proporção molar de um flavonoide no composto de inclusão de flavonoides e o flavonoide pouco solúvel (flavonoide

pouco solúvel/flavonoide no composto de inclusão) é a partir de 0,001 a 0,1 e a proporção molar de um flavonoide no composto de inclusão de flavonoides e a ramnose (ramnose/flavonoide) é a partir de 0,8 a 1,2 e em que a ciclodextrina é um ou mais membros selecionados a partir do grupo que consiste em  $\beta$ -ciclodextrina,  $\beta$ -ciclodextrina ramificada e  $\gamma$ -ciclodextrina.

11. Composição que contém um composto de inclusão de flavonoides, de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que a proporção molar de hesperetina-7-glucosídeo e da ciclodextrina (ciclodextrina/hesperetina-7-glucosídeo) é a partir de 1,0 a 1,9 e em que a doçura é reduzida.

12. Composição que contém um composto de inclusão de flavonoides que compreende um composto de inclusão de flavonoides, um flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo e uma ramnose, caracterizada pelo fato de que o composto de inclusão de flavonoides compreende naringenina-7-glucosídeo incluída em  $\beta$ -ciclodextrina, em que a proporção molar da naringenina-7-glucosídeo e da  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -ciclodextrina/naringenina-7-glucosídeo) é a partir de 1,0 a 3,0, a solubilidade em água da naringenina-7-glucosídeo é a partir de 0,01% ou mais, a proporção molar de um flavonoide no composto de inclusão de flavonoides e o flavonoide pouco solúvel (flavonoide pouco solúvel/flavonoide no composto de inclusão) é a partir de 0,001 a 0,1 e a proporção molar de um flavonoide no composto de inclusão de flavonoides e a ramnose (ramnose/flavonoide) é a partir de 0,8 a 1,2.

13. Gênero alimentício, caracterizado pelo fato de que compreende a composição que contém um composto de inclusão de flavonoides como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 12.

14. Medicamento, caracterizado pelo fato de que compreende a composição que contém um composto de inclusão de flavonoides como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 12.

15. Cosmético, caracterizado pelo fato de que compreende a composição que contém um composto de inclusão de flavonoides como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 12.

16. Composição que contém um composto de inclusão de flavonoides que compreende um composto de inclusão de flavonoides e uma ramnose, caracterizada pelo fato de que a proporção molar de um flavonoide no composto de inclusão de flavonoides e a ramnose (ramnose/flavonoide) é a partir de 0,8 a 1,2, em que o composto de inclusão de flavonoides compreende isoquercitrina incluída em  $\gamma$ -ciclodextrina, em que a proporção molar de isoquercitrina e  $\gamma$ -ciclodextrina ( $\gamma$ -ciclodextrina/isoquercitrina) é a partir de 0,9 a 1,8 e em que a solubilidade em água da isoquercitrina em água é de 2% ou mais.

17. Composição que contém um composto de inclusão de flavonoides que compreende um composto de inclusão de flavonoides e uma ramnose, caracterizada pelo fato de que a proporção molar de um flavonoide no composto de inclusão de flavonoides e ramnose (ramnose/flavonoide) é a partir de 0,8 a 1,2, em que o composto de inclusão de flavonoides compreende isoquercitrina incluída em  $\gamma$ -ciclodextrina em que a proporção molar de isoquercitrina e  $\gamma$ -ciclodextrina ( $\gamma$ -ciclodextrina/isoquercitrina) é a partir de 0,9 a 4,0 e em que a solubilidade em água da isoquercitrina é de 2,5% ou mais.

18. Composição que contém um composto de inclusão de flavonoides, de acordo com a reivindicação 16 ou 17, caracterizada pelo fato de que a proporção molar de isoquercitrina e  $\gamma$ -ciclodextrina ( $\gamma$ -ciclodextrina/isoquercitrina) é a partir de 1,0 a 1,8.

19. Composição que contém um composto de inclusão de flavonoides que compreende um composto de inclusão de flavonoides e uma ramnose, caracterizada pelo fato de que a proporção molar de um flavonoide no composto de inclusão de flavonoides e a ramnose (ramnose/flavonoide) é a partir de 0,8 a 1,2, em que o composto de

inclusão de flavonoides compreende isoquercitrina incluída em  $\beta$ -ciclodextrina, em que a proporção molar de isoquercitrina e  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -ciclodextrina/isoquercitrina) é a partir de 1,0 a 3,0 e em que a solubilidade em água da isoquercitrina é 0,1% ou mais.

20. Composição que contém um composto de inclusão de flavonoides que compreende um composto de inclusão de flavonoides e uma ramnose, caracterizada pelo fato de que a proporção molar de um flavonoide no composto de inclusão de flavonoides e a ramnose (ramnose/flavonoide) é a partir de 0,8 a 1,2, em que o composto de inclusão de flavonoides compreende hesperetina-7-glucosídeo incluído em uma ciclodextrina, em que a proporção molar de hesperetina-7-glucosídeo e ciclodextrina (ciclodextrina/hesperetina-7-glucosídeo) é a partir de 1,0 a 3,0, em que uma solubilidade em água da hesperetina-7-glucosídeo é 0,01% ou mais e em que a ciclodextrina é um ou mais membros selecionados a partir do grupo que consiste em  $\beta$ -ciclodextrina e  $\gamma$ -ciclodextrina.

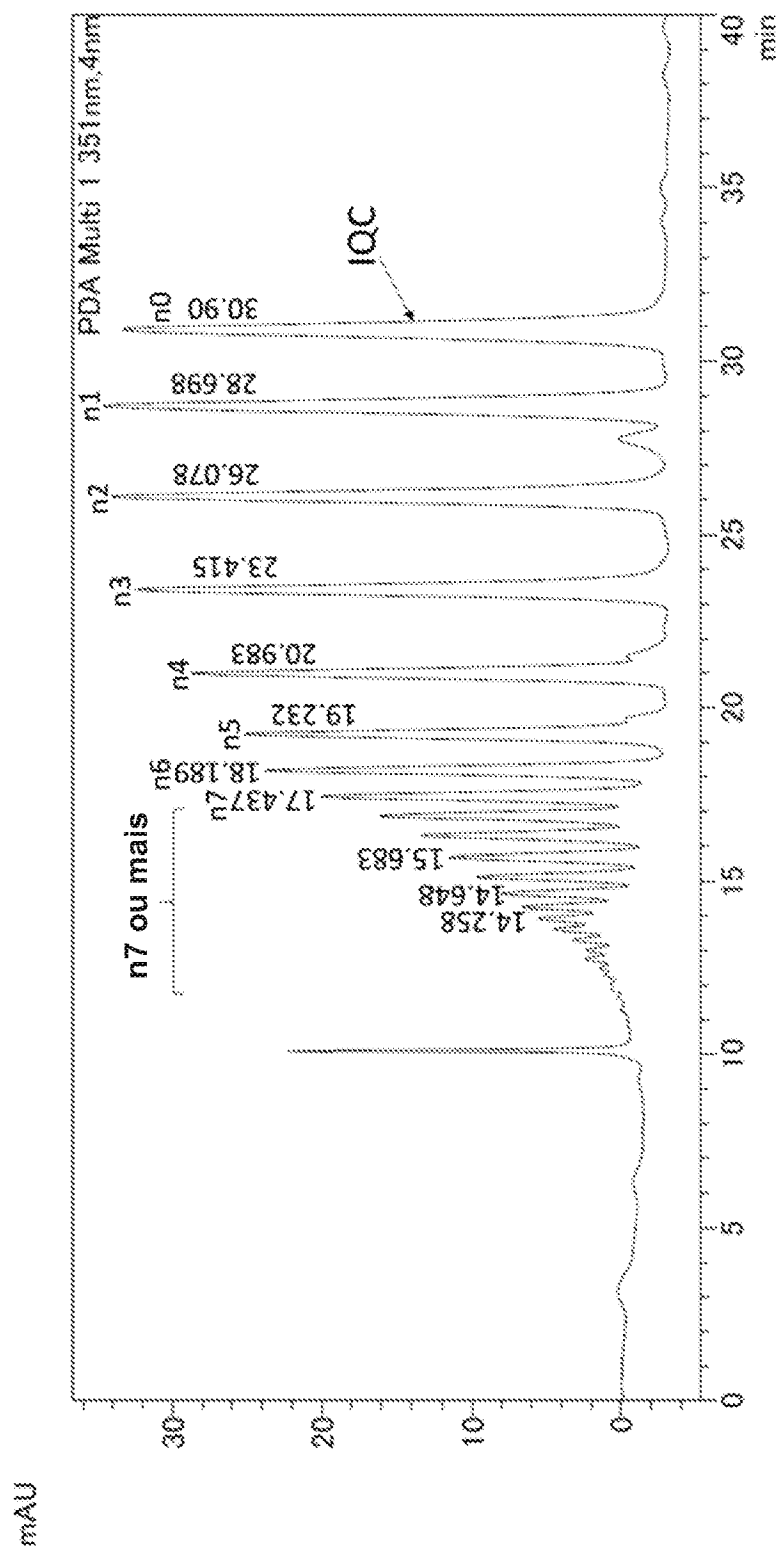
21. Composição que contém um composto de inclusão de flavonoides, de acordo com a reivindicação 20, caracterizada pelo fato de que a proporção molar de hesperetina-7-glucosídeo e ciclodextrina (ciclodextrina/hesperetina-7-glucosídeo) é a partir de 1,0 a 1,9.

22. Composição que contém um composto de inclusão de flavonoides que compreende um composto de inclusão de flavonoides e uma ramnose, caracterizada pelo fato de que a proporção molar de um flavonoide no composto de inclusão de flavonoides e a ramnose (ramnose/flavonoide) é a partir de 0,8 a 1,2, em que o composto de inclusão de flavonoides compreende uma naringenina-7-glucosídeo incluída em  $\beta$ -ciclodextrina, em que a proporção molar de naringenina-7-glucosídeo e ciclodextrina ( $\beta$ -ciclodextrina/naringenina-7-glucosídeo) é a partir de 1,0 a 3,0 e em que a solubilidade em água da naringenina-7-glucosídeo é 0,01% ou mais.



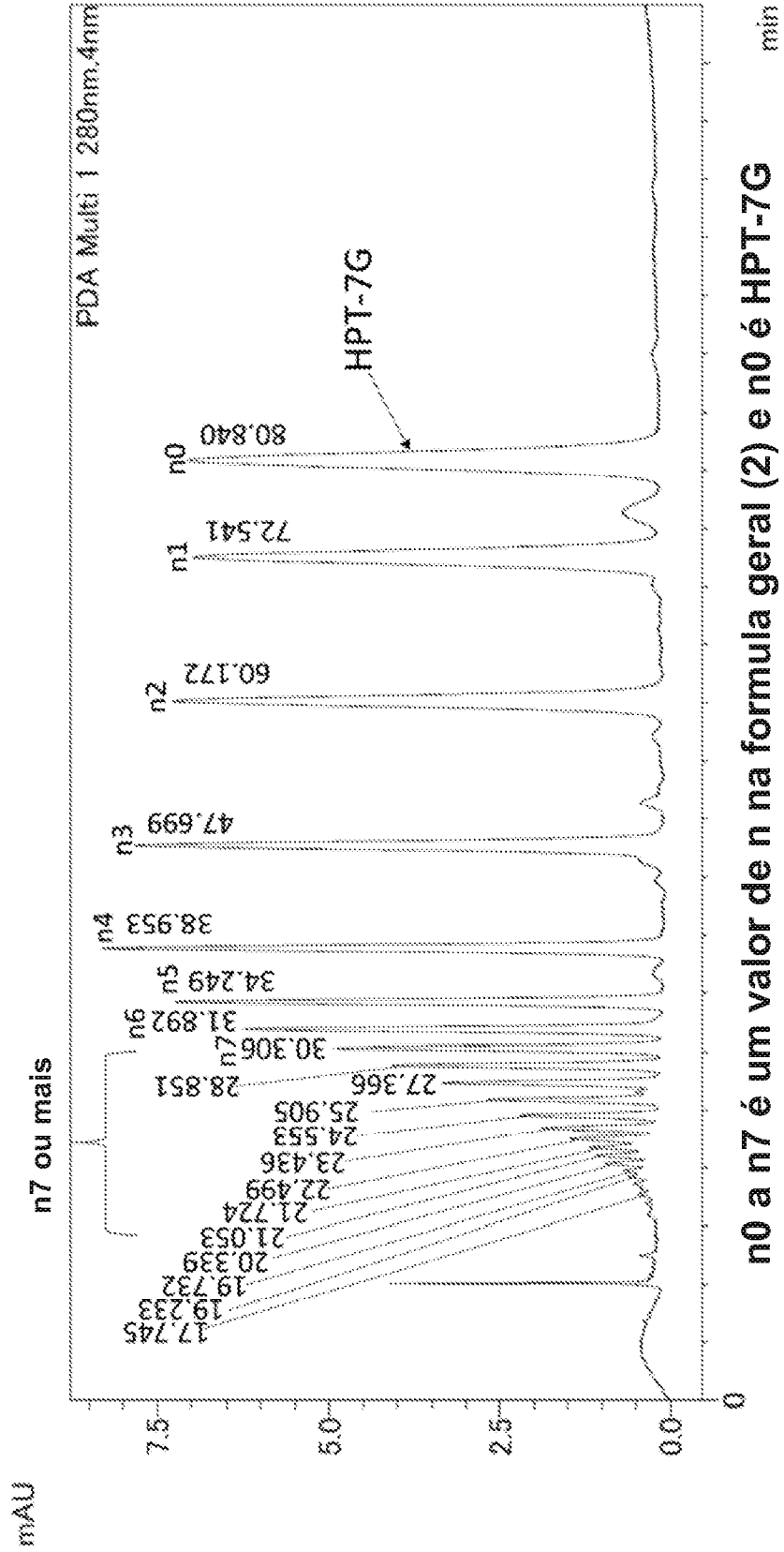
**FIG. 1** Cromatograma por HPLC do Exemplo 39

&lt;Cromatograma&gt;

**n0 a n7 é um valor de n na formula geral (1) e n0 é IQC**

**FIG. 2** Cromatograma por HPLC do Exemplo 40

<Cromatograma>



n0 a n7 é um valor de n na formula geral (2) e n0 é HPT-7G

## RESUMO

Patente de Invenção: "MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE CLATRATO DE FLAVONOIDE".

A presente invenção refere-se a um método para produzir um composto de inclusão de flavonoide que inclui uma etapa de clivagem que inclui tratamento de um flavonoide pouco solúvel que tem uma estrutura de ramnosídeo com uma enzima que tem uma atividade de ramnosidase na presença de uma ciclodextrina para clivar a ramnose. De acordo com o método de produção da presente invenção, um composto de inclusão de flavonoide e uma composição de glicosídeos de flavonoides que tem excelente solubilidade em água podem ser produzidos com eficiência, de modo que o composto e a composição possam ser adequadamente usados nos campos de medicamentos, alimentos, alimentos saudáveis, alimentos para uso específico na saúde, cosméticos e assim por diante.