



(12)

## BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2017 00578**

(22) Data de depozit: **18/08/2017**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28/02/2024** BOPI nr. **2/2024**

(41) Data publicării cererii:  
**28/02/2019** BOPI nr. **2/2019**

(73) Titular:  
• **STAȚIUNEA DE CERCETARE  
DEZVOLTARE PENTRU VITICULTURĂ ȘI  
VINIFICAȚIE IAȘI,**  
ALEEA MIHAIL SADOVEANU NR. 48, IAȘI,  
IS, RO

(72) Inventatori:  
• **NECHITA ANCUȚA,**  
ALEEA MIHAIL SADOVEANU 16B, BL.V1,  
SC.B, AP.5, IAȘI, IS, RO;  
• **DELEANU CONSTANTIN,**  
COMUNA CEPLENIȚA, IAȘI, IS, RO;  
• **NICULAU MARIUS,**  
ALEEA MIHAIL SADOVEANU 16B, BL.V1,  
SC.B, AP.5, IAȘI, IS, RO;

• **FILIMON VASILE RĂZVAN,**  
STR.MOLDOVEI NR.4, BL.MOLDOVA,  
SC.C, ET.7, AP.27, PAȘCANI, IS, RO;  
• **MIHAI COSMIN TEODOR,**  
STR.PĂCURARI NR.128, BL.586, SC.A,  
ET.2, AP.8, IAȘI, IS, RO;  
• **PAȘA RODICA,** STR.DE NORD NR.14,  
IAȘI, IS, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:  
**FILIMON V. R., NECHITA A., DAMIAN D.,  
PAȘA R., FILIMON R., BĂETU M., MIHAI C.  
T., NICULAU M., "LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE  
SERIA HORTICULTURĂ", USAMV IAȘI,  
VOL. 60(1), 2017; US 6800433**

(54) **PROCEDEU DE EXTRAȚIE A PROANTOCIANIDINELOR  
CONDENSATE POLIMERICE DIN SEMINȚE DE STRUGURI  
ȘI METODĂ DE PURIFICARE A ACESTORA PENTRU  
OBTINEREA UNUI BIOPRODUS NATURAL**



# RO 133090 B1

1           Invenția se referă la un procedeu de extracție etapizată a compușilor fenolici cu alcool  
2 etilic, din semințele de struguri delipidate, extracția lichid/lichid (L/L) a extractului concentrat  
3 polifenolic cu eter dietilic, pentru obținerea precipitatului brut de proantocianidine (PA)  
4 condensate și la o metodă de purificarea acestuia printr-o metodă bazată pe proprietatea de  
5 insolubilizare în apă distilată.

6           Proantocianidinele (PA) numite și taninurile condensate au ca structură de bază  
7 unități de flavan-3-ol, secvențial polimerizate, prin legături  $4\beta \rightarrow 6$ ;  $4\beta \rightarrow 8$ ;  $4\beta \rightarrow 8 \cdot 2\beta \rightarrow 7$ . În  
8 acest context proantocianidinele denumite în continuare PA condensate de la dimeri la  
9 pentameri, sunt numite proantocianidine oligomerice, iar de la hexameri sau cu grad mai înalt  
10 de polimerizare sunt numite PA condensate polimerice.

11           Semințele de struguri reprezintă sursa cea mai bogată în compuși fenolici extractibili  
12 în care grupul compușilor flavonidelor este cel mai abundent, incluzând monomeri flavan-3-  
13 ol, PA condensate oligomerice și PA condensate polimerice.

14           PA condensate reprezintă o sursă naturală importantă datorită proprietăților biologice  
15 active cu efect antiinflamator, antiviral, antitumoral, antibacterian, antifungic și antioxidant  
16 (**EN-QIN Xia ș.a., *Biological Activities of Polyphenols from Grapes*. Int. J. Mol Sci.,**  
17 **11(2): 622-646, 2010; Bhise S. ș.a., *Antioxidant property and health benefits of grape***  
18 ***byproducts*, J. Post Harvest Technol, 2(1): 1-11, 2014**). Astfel, PA condensate din  
19 semințele de struguri pot fi utilizate, ca principii bioactive în industria farmaceutică și cosme-  
20 tică ca antioxidanți naturali în industria alimentară și în agricultură în combaterea unor boli.

21           Sunt cunoscute diferite procedee de extracție a compușilor fenolici oligomerici și  
22 metode de purificare a preparatelor brute. Acestea sunt prezentate atât în literatura  
23 nonbrevet din bibliografia anexată cât și în brevetele **EP 0632480** (1986), **US 5484594**  
24 (1996), **US 5273262** (1998), **US 6800433** (2004). În aceste brevete extracțiile compușilor  
25 fenolici PA oligomerice s-au realizat folosind ca solvent apa sau un amestec apă solvent  
26 (acetona, alcool) la temperaturi între 5 și 55°C, timpul de extracție, de la câteva h la 10 zile,  
27 extracțiile fiind repetate de două sau mai multe ori.

28           Metodele de obținere a PA oligomerice din extractele polifenolice brute cunoscute s-  
29 au efectuat în mai multe etape, prin filtrări pe membrane speciale urmate de extracții și  
30 precipitări repetate cu solvenți. Eliminarea contaminanților: acizi fenolici, monomeri, săruri,  
31 proteine, zaharuri s-a efectuat prin cromatografia pe coloane, obținându-se în final preparate  
32 PA oligomerice cu diferite grade de puritate de la 60% până la 90%.

33           În studiile analitice cunoscute extracția compușilor fenolici din semințe de struguri se  
34 efectuează utilizând concentrații mari de solvenți (acetona, alcool etilic) în amestec cu apă  
35 80% v/v cât și direct 100% solvent, la diferite temperaturi, 25°C, 35°C și 50°C, timp de  
36 3...12 h, sau mai îndelungat în funcție de temperatură. Scopul urmărit de autori în procesele  
37 extractive cu solvenții menționați a fost de a evalua cantitativ diferite clase de compuși  
38 fenolici (**Negro C. ș.a., *Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape***  
39 ***marc extracts*. Bioresource Technology, 87, 41-4, 2003, Wang C.Z., ș.a., *Polyphenol***  
40 ***contents in grape-seed extracts correlate with antipica effects in cisplatin-treated rats*,**  
41 ***The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, vol. 11, nr. 6, pp. 1059-1065,**  
42 **2005), de a extrage PA condensate cu alcool etilic 96% (Duca Ghe., *Studies on the water***  
43 ***solubilization processes of oenotannins and their physico-chemical properties*,**  
44 ***Chemistry Journal of Moldova*, vol. 1, nr. 1 p: 60-64, 2006), de a optimiza extracțiile**  
45 **compușilor fenolici cu etanol folosind diferite concentrații de la 0-100% (Chew K. K. ș.a.,**  
46 ***Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the***  
47 ***recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of Orthosiphon stamineus***

# RO 133090 B1

<b>extracts, International Food Research Journal, 18(4): 1427-1435, 2011)</b> sau de a verifica	1
eficiența solventilor organici (etanol, acetonă) în amestec cu apă v/v și 100% solvent	
<b>(Vayupharp B. ș.a., Recovery of antioxidants from grape seeds and its application in</b>	3
<b>fried food, J. Food Process Technol 3:152, 2012).</b> În ce privește extracția compușilor	
fenolici, obișnuit s-a utilizat metoda de extracție pe principiu Soxhlet.	5
Informațiile obținute relevă faptul că PA condensate cu grad de polimerizare înalt, pot	
fi extrase când se utilizează solventi în concentrații mari.	7
Noutatea invenției constă într-un procedeu de extracție nou și o metodă de purificare	
nouă a preparatului brut de proantocianidine (PA) condensate polimerice obținut din	9
semințele de struguri delipidate aparținând soiului Fetească neagră.	
Procedeul propus, conform invenției înlătură dezavantajele procedeelelor cunoscute	11
prin aceea că, constă într-o serie de patru etape alcătuite din procese și operațiuni care	
conduc la obținerea preparatului brut de proantocianidine condensate polimerice astfel:	13
A. Extracția etapizată a compușilor fenolici cu alcool etilic 96% din deșeurile de semințe	
de struguri delipidate.	15
B. Concentrarea extractului polifenolic cumulat până la un volum și densitate	
determinată.	17
C. Extracția lichid/lichid (L/L) a extractului polifenolic concentrat/solvent eter dietilic	
și obținerea precipitatului brut de PA condensate polimerice.	19
Procedeul de extracție este urmat de o metodă de purificare a precipitatului brut de	
PA condensate polimerice.	21
În cele ce urmează este prezentat în detaliu procedeul și metoda propuse de	
inventatori pentru extracția și purificarea preparatului brut de proantocianidine.	23
A. Extracția etapizată a compușilor fenolici din deșeurile vegetale delipidate se efectuează	
în trei etape la temperatură de 30°C utilizând ca solvent alcoolul etilic 96%. Prima extracție	25
s-a efectuat la un raport solid/lichid de 1/4, în condiții de agitare intermitentă timp de 24 h.	
Extractul polifenolic 1 obținut a fost separat de reziduu vegetal. Au urmat încă două extracții	27
ale reziduuului vegetal în care raportul solid/lichid a fost de 1/3 și 1/2, obținându-se astfel	
extractele polifenolice 2 și 3. Extractele 1, 2 și 3 au fost reunite în extractul cumulat, care a	29
fost depozitat timp de 6 zile la temperatura de 4°C.	
Această metodă de abordare a proceselor extractive este mult mai eficientă din punct	31
de vedere economic comparativ cu metoda de extracție Soxhlet deoarece:	
- permite prelucrarea unor cantități mari de material vegetal în procesul de extracție	33
a compușilor fenolici;	
- previne saturarea solventului în compuși fenolici prin separare fazică a extractelor	35
obținute;	
- reduce consumul de solvent în etapele II și III, deoarece în prima etapă la raportul	37
1/4 se extrage cea mai mare cantitate de compuși fenolici;	
- consumul de energie pentru menținerea temperaturii de 30°C este redus,	39
comparativ cu metoda Soxhlet, în care procesul extractiv se realizează la 70...80°C;	
- agitarea intermitentă pe parcursul proceselor extractive favorizează reducerea	41
timpului de extracție.	
B. Extractul fenolic cumulat, din etapa A, se filtrează, iar filtratul este concentrat sub	43
vid la temperatura de 37°C în două trepte. În prima treaptă, concentrarea este efectuată până	
la un volum de 300-500 ml, urmată de centrifugare timp de 30 min la 8000 rpm pentru	45
eliminarea particulelor fine de material vegetal. În a doua treaptă concentrarea extractului	
s-a efectuat până la un volum determinat cu densitate de 1,0...1,1 g/ml.	47

# RO 133090 B1

1 În acesta etapă s-a recuperat solventul, alcoolul etilic, care poate fi reutilizat în etapa  
A, pentru extracția compușilor fenolici din deșeurile de semințe de struguri delipidat fără a  
3 afecta randamentul de extracție. De asemenea, reziduu vegetal rezultat din procesul de  
extracție poate fi utilizat ca îngrășământ organic natural, nefiind poluant, fapt demonstrat  
5 după administrarea în sol, prin analizele microbiologice și analiza enzimatică a dehidro-  
genazei active și potențiale în sol, utilizată ca enzimă de referință în testarea poluanților.

7 C. Extracția lichid/lichid (L/L) a extractului polifenolic concentrat, obținut în etapa B,  
cu eter dietilic conduce la obținerea unui preparat brut de PA condensate sub forma unui  
9 precipitat solid consistent, care se separă de faza lichidă după 20...30 min. Precipitatul brut  
de PA condensate format este adus la greutate constantă la temperatura de 40°C. După  
11 dizolvarea precipitatului brut de PA condensate în alcool etilic s-a determinat concentrația  
totală de polifenoli (CFT) exprimată în mg GAE/mg preparat prin metoda Folin-Ciocalteu  
13 (**Singleton și Rossi, *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic -  
phosphotungstic acid reagents*, Am. J. Enol. Vitic, vol. 16, 144-158, 1965**) și activitatea  
15 antioxidantă (AA%/100 μg preparat) cu reactivul DPPH, conform metodei propuse de **Brand-  
Williams ș.a., (1994)**, cu modificarea adusă de **Miliauskas ș.a., *Screening of radical  
17 scavenging activity of some medicinal and aromatic plants extracts*, Food Chem. vol.  
85, pp: 231-237, (2004)**. Din analizele efectuate s-a constatat că preparatul brut de PA  
19 condensate conține 0,676 mg GAE/mg preparat brut și are o activitate antioxidantă de  
94,186%/100 μg. În această etapă, s-a recuperat solventul eter dietilic din faza lichidă.

21 Metoda de purificare propusă a preparatului brut de PA condensate nu necesită  
operații complexe deoarece se bazează pe proprietatea PA condensate de a fi insolubile în  
23 apă. În vederea utilizării precipitatului brut de PA condensate ca substrat pentru obținerea  
unui bioprodus natural cu posibilitate de comercializare în industria farmaceutică, cosmetică  
25 și alimentară este necesară etapa de purificare.

Prin solubilizarea în alcool etilic a preparatului brut de PA condensate și efectuarea  
27 analizei la UHPLC (metoda **Castellari ș.a., *Analysis of wine phenolics by high-  
performance liquid chromatography using a monolithic type column*, Journal of  
29 Chromatography A., vol. 973, pp. 221-227, 2008**), conform cromatogramei din fig. 1, s-au  
identificat pe lângă picul amplu al PA condensate polimerice, picuri ale acizilor fenolici (galic,  
31 protocatehic, *p*-hidroxibenzoic, *m*-hidroxibenzoic, siringic), picuri ale monomerilor de  
catechină și epicatechină și un număr de picuri neidentificate. De asemenea, este posibilă  
33 prezența și altor contaminanți, de exemplu, zaharuri și proteine, însă cantitativ sunt minimali-  
zați datorită utilizării în procesele extractive a solventului concentrat alcool etilic 96%, care  
35 nu favorizează antrenarea acestora din deșeurile de semințe de struguri delipidat.

Protocolul de lucru al metodei de purificare, cuprinde următoarele operațiuni:

37 1. Precipitatul brut de PA condensate, obținut după 20...30 min, în etapa C a  
procedurii de extracție, se reia în 20...50 ml apă distilată cu pH 7,0 și se omogenizează  
39 până la dispariția aglomerărilor de precipitat.

41 2. Produsul omogenizat se dispersează în 1,950 l apă distilată cu pH 7,0. După 10  
min se instalează procesul de depunere gravitațională a PA condensate, care continuă timp  
de 60 min, formându-se în final un depozit dens. Această operațiune se execută încă o dată.

43 3. Supernatantele s-au eliminat prin sifonare și au fost analizate la UHPLC, iar  
depozitul de PA condensate s-a centrifugat la 8000 rpm timp de 30 min. După eliminarea  
45 apei distilate din cuvele de centrifugare, precipitatul de PA condensate purificat a fost reluat  
în 20...40 ml alcool etilic 96%.

# RO 133090 B1

4. Următoarele operațiuni au fost eliminarea solventului la temperatura de 40°C, până la greutate constantă și condiționarea PA condensate purificate în stare solidă în flacoane de sticlă brună la temperatura de -10°C.

Proprietatea de solubilizare în alcool etilic 96% a preparatului de PA condensate purificat nu a fost afectată în urma acestui tratament. De asemenea, valorile activității antioxidante (AA%) și cantitatea totală de fenoli(CFT) a preparatului purificat au crescut comparativ cu valorile preparatului nepurificat de la 94,186% până la 94,819% și respectiv de la 0,676 mg GAE/mg preparat brut la 0,898 mg GAE/mg preparat purificat.

Din analiza cromatogramelor la UHPLC (fig. 2, 3 și 4) a probelor de apă rezultate în procesul de purificare a precipitatului brut de PA condensate, s-a constatat reducerea progresivă a amplitudinii picurilor acizilor fenolici și a monomerilor catechină și epicatechină.

Preparatul de PA condensat purificat dizolvat în alcool metilic a fost analizat UHPLC. Conform fig. 5, în cromatogramă nu mai apar picurile acizilor fenolici și monomerilor, ci doar un pic larg, amplu, spre finalul cromatogramei, care corespunde PA condensate polimerice cu o distribuție a indicelui de polimerizare larg comparabil cu metodele de excluziune sterică de minim cinci ordine dimensionale ( $n$  indicele de polimerizare).

Gradul de puritate al produsului de PA a fost verificat și prin extracția selectivă cu solvenți a compușilor monomerici și oligomerici (fracția F1 + F2), și a fracției polimerice (F3) prin separarea pe cartuș de tip C18 Sep - PAC (**Sun B. ș.a., Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization, J. Agric. Food Chem., 46, p. 1390-1396, 1998**). Eluția s-a efectuat cu apă distilată pH 7,0. După uscarea cartușului, s-a continuat eluția cu acetat de etil pentru a separa PA oligomerice și monometrice și apoi eluția cu alcool etilic pentru separarea PA polimerice. Frațiile obținute (F1 + F2) și (F3) au fost evaporate, iar reziduurile uscate la 105°C au fost cântărite. Reziduul fracției (F1 + F2) a fost de 2,8 mg/100 mg preparat purificat, iar al fracției polimerice F3 de 95 mg/100 mg preparat purificat. Aceste rezultate relevă că prin metoda propusă de purificare a precipitatului brut de PA condensate s-a obținut un preparat de PA condensate polimerice cu o puritate de 95%.

Se prezintă în continuare un exemplu de metodă de realizare a invenției.

## Exemplu

1 kg de deșeu de semințe de struguri delipidat a fost utilizat în extracția etapizată a compușilor fenolici cu raporturile solid/lichid: 1/4, 1/3 și 1/2, folosind ca solvent alcoolul etilic de 96%, la temperatura de 30°C, timp de 24 h în fiecare etapă. În total s-au consumat 9 l solvent. Volumul cumulat al extractelor (1 + 2 + 3) a fost după filtrare de 7,650 l.

Extractul cumulat, conform etapelor prezentate în descrierea detaliată a proceselor extractive a fost concentrat până la 500 ml (A), urmat de centrifugare timp de 20 min la 8000 rpm și concentrarea până la volumul de 225 ml (B). Din totalul de 7,650 l solvent s-au recuperat 7,300 l.

Urmează apoi extracția lichid/lichid a extractului concentrat B cu 675 ml eter dietilic pentru obținerea precipitatului brut de proantocianidine (PA) condensate și recuperarea din faza lichidă a eterului dietilic, respectiv 615 ml.

Precipitatul brut de PA condensate a fost purificat, conform metodei de purificare prezentată detaliat, iar în final s-a obținut 30,693 g preparat PA condensat purificat, solubil în alcool etilic și insolubil în apă distilată. Inducerea proprietății de solubilizare în apă a PA condensate purificate s-a efectuat prin tratamentul fizico-chimic cu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, în condiții optime determinate privind cantitatea de agent oxidant/preparat PA condensate purificat,

## RO 133090 B1

- 1 temperatură și timp de contact al reactanților. Rezultatul tratamentului fizico-chimic a condus  
la obținerea unui bioprodus natural solubil în apă distilată cu activitate AA de 91,38%,  
3 activitate antibacteriană față de bacteriile test *Staphilococcus aureus* și *Escherichia coli*,  
precum și activitate antifungică față de *Botritis cinerae*.
- 5 În continuare, se prezintă cromatograma preparatului brut de PA condensate (fig. 1),  
cromatogramele probelor de apă rezultate în diversele faze ale procesului de purificare (fig.  
7 2, 3 și 4) și cromatograma preparatului de PA condensate purificat (fig. 5).

# RO 133090 B1

## Revendicări

1

1. Procedeu de extracție a proantocianidelor condensate polimerice din deșeul de semințe de struguri delipidat prin extracția compușilor fenolici cu alcool etilic, **caracterizat prin aceea că**, deșeul de semințe de struguri delipidat se supune unei extracții totale a compușilor fenolici cu alcool etilic 96% în trei etape, la o temperatură de 30°C, cu rapoarte solid/lichid 1/4, 1/3 și 1/2, timp de 24 h, extractele rezultate fiind cumulate și depozitate 6 zile la o temperatură de 4°C, apoi sunt filtrate și filtratul rezultat este concentrat sub vid la o temperatură de 37°C în două trepte, în prima treaptă până la volumul de 300...500 ml urmată de o centrifugare timp de 30 min la 8000 rpm pentru eliminarea particulelor fine de material vegetal, iar în a doua etapă până la un volum de lichid care are o densitate de 1,0...1,1 g/ml și în final are loc o extracție lichid/lichid cu eter dietilic a proantocianidinelor condensate polimerice obținându-se un precipitat brut cu un conținut total de polifenoli de 0,676 mg GAE/mg de precipitate și o activitate antioxidantă de 94,186%.

2. Metodă de purificare a precipitatului brut obținut prin procedeul descris în revendicarea 1, **caracterizată prin aceea că**, precipitatul brut de proantocianidine condensate polimerice este preluat în apă distilată ca solvent, omogenizat până la dispariția aglomerărilor de precipitat, după care are loc sedimentarea proantocianidinelor condensate polimerice, sifonarea apei distilate, preluarea din nou a precipitatului în apă distilată respectându-se aceleași operațiuni, urmată de dispersarea precipitatului în apă distilată și centrifugarea acestuia timp de 30 min la 8000 rpm, dizolvarea acestuia în alcool etilic 96% și în final eliminarea solventului la o temperatură de 40°C până la greutate constantă rezultând un produs cu o cantitate total de polifenoli de 0,898 mg GAE/mg preparat, o activitate antioxidantă de 94,819% și un grad de puritate de 95%.

# RO 133090 B1

(51) Int.Cl.

C09K 15/08 (2006.01),

A61Q 19/00 (2006.01)

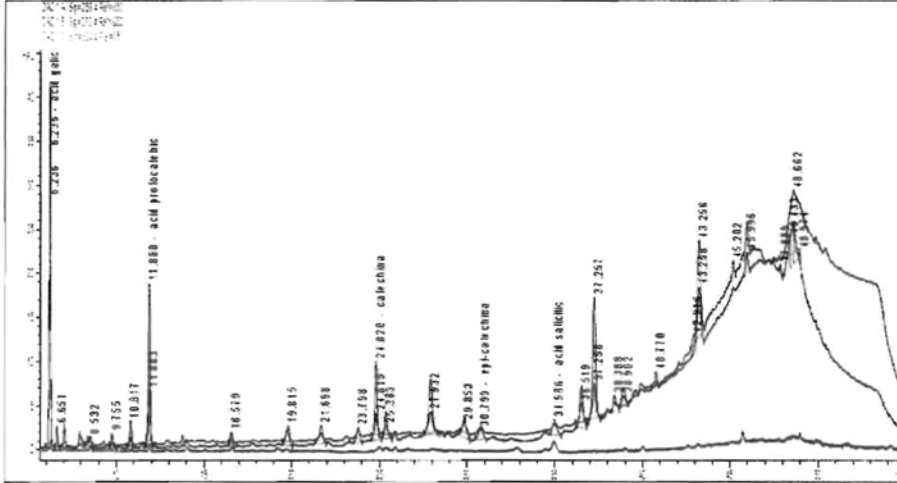


Fig. 1

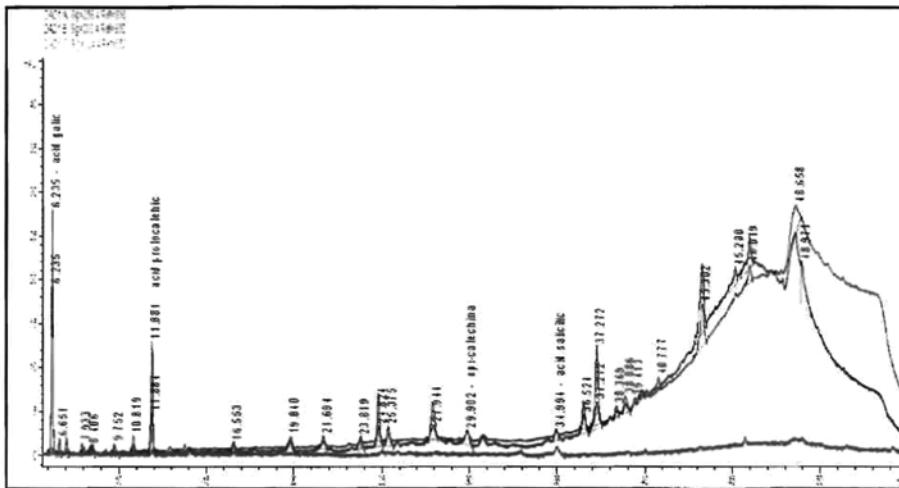


Fig. 2



(51) Int.Cl.

C09K 15/08 (2006.01);

A61Q 19/00 (2006.01)

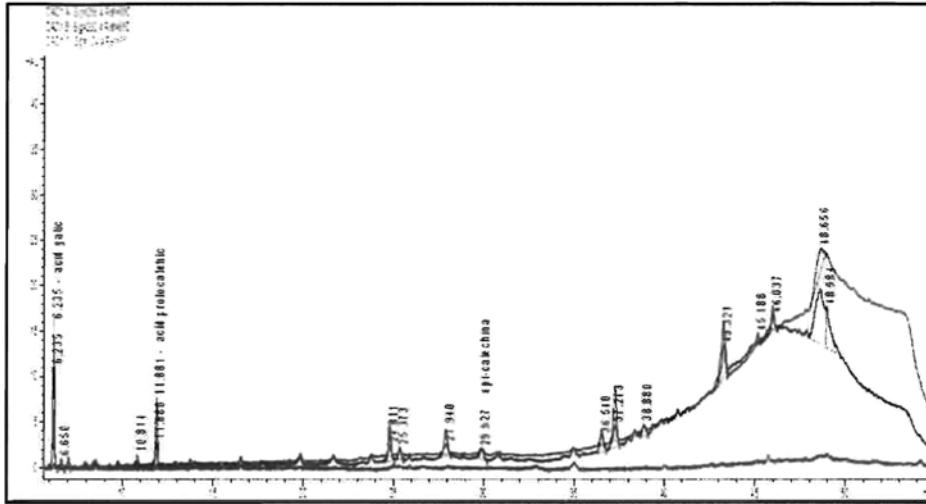


Fig. 3

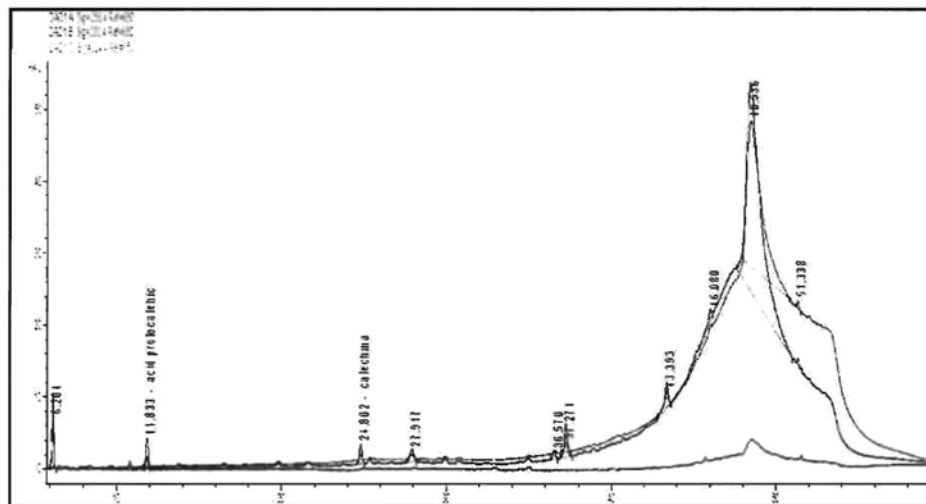


Fig. 4

(51) Int.Cl.

C09K 15/08 (2006.01);

A61Q 19/00 (2006.01)

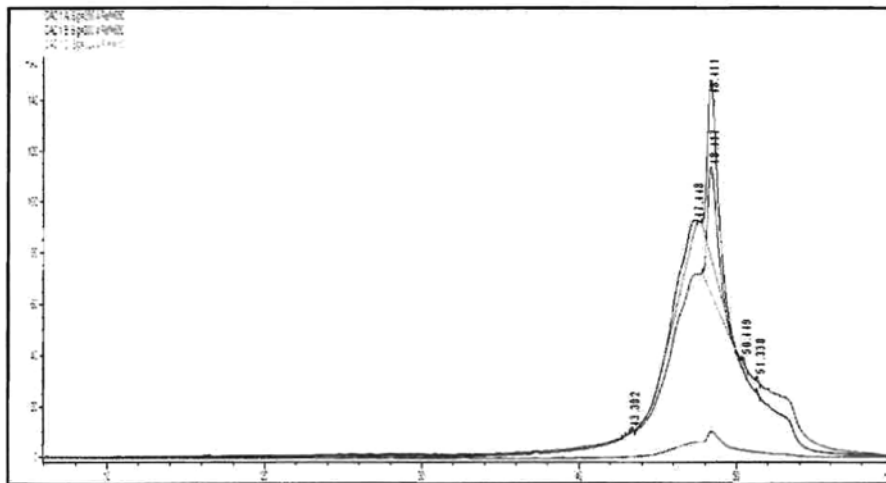


Fig. 5



Editare și tehnoredactare computerizată - OSIM  
Tipărit la Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci  
sub comanda nr. 43/2024