



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2017 00763

(22) Data de depozit: 28/09/2017

(41) Data publicării cererii:
29/03/2019 BOPI nr. 3/2019

(71) Solicitant:
• SALMED FARMA S.R.L., STR.CARPAȚI
NR.8, MEDIAȘ, SB, RO

(72) Inventatori:
• TRIFOI ANCUȚA ROXANA,
BD.INDEPENDENȚEI NR.71, SC.A, AP.5,
BISTRIȚA, BN, RO;
• DOBRE DELIA IONELA, STR.MUREȘ
NR.25, MEDIAȘ, SB, RO;

• GHERMAN TIMEA, ALEEA FAGULUI
NR. 2, BL. C7, SC. 1, AP. 15, GHERLA, CJ,
RO;
• CRUCEAN AUGUSTIN, STR.CUZA VODĂ
NR.4, MEDIAȘ, SB, RO;
• BLĂJAN OLIMPIU, STR.TEILOR NR.11,
MEDIAȘ, SB, RO;
• RÂPĂ MARIA, ALEEA GORNEȘTI NR.3,
BL.52, SC.1, AP.2, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI CONCENTRAT
DE POLIFENOLI CU COMPONENT ACTIV PRINCIPAL
TRANS-RESVERATROL**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui concentrat de polifenoli cu component activ principal trans-resveratrol. Procedeu conform invenției constă în aceea că subprodusele rezultate din sectorul viticol și de vinificație pentru specia *Vitis vinifera* sunt supuse etapelor de extracție fizico-chimică și enzimatică, în prezența β -glucozidazei depusă pe particule magnetice, la temperatura de 40...45°C, pH de 4...6, timp de

hidroliză de 12...24 h, urmată de o extracție alcoolică la reflux timp de 1 h la 70...80°C, rezultând un randament de extracție polifenoli totali în polifenoli de 67%, cu o concentrație în resveratrol de minimum 90%, având o puritate de 99,8%.

Revendicări: 3



PROCEDEU DE OBTINERE A UNUI CONCENTRAT DE POLIFENOLI CU COMPONENT ACTIV PRICIPAL *trans- RESVERATROL*

Utilizarea componentilor bioactivi din plante sub formă de ceaiuri sau diferite extracte, mai mult sau mai puțin concentrate este o practică foarte veche folosind metode de extracție chimică cu diverși solvenți. Ele pot fi combinate cu metode fizice sau biochimice.

Invenția se referă la un procedeu de extracție și purificare a resveratrolului și glicozidei acestuia, din pielița boabelor de struguri, din pielița sâmburilor de struguri și din mlădițele viței de vie tăiate în primăvară înainte de înflorirea și formarea viitoarei recolte de struguri roșii, prin combinarea metodelor fizice, chimice și enzimaticice.

Randamentul, compoziția și puritatea compușilor fenolici recuperați din materialele vegetale depind de natura chimică (fenoli simpli și complecși), dimensiunea și omogenitatea esanționului, metoda de extracție (solvenți apoși sau organici, fluide supercritice, extracții în fază solidă, timpul și condițiile de depozitare, precum și de prezența substanțelor interferente. Extractele fenolice brute conțin amestecuri complexe de diferiți fenoli și eterii lor, care sunt cu solubilități diferite în solvenții de extracție. Solvenții de extracție convenționali, cum ar fi : acetona, acetatul de etil, etanolul și metanolul au fost folosiți pentru recuperarea polifenolilor din materialele vegetale și eficiența acestora variază în funcție de solventul utilizat.

Se cunoaște că cea mai mare cantitate de resveratrol se găsește în rădăcina plantei *Polygonum cuspidatum*, care nu poate fi consumată în stare naturală. Coaja și sâmburii de struguri roșii [*Vitis vinifera L.*], afinele [*Vaccinium myrtillus L.*], murele [*Rubus hirtus W.*, *Rubus hirtus K.*] merișorul [*Vaccinium vitis idaea*] și arahidele [*Arachis hypogaea L.*] sunt surse de resveratrol, însă pentru a asimila cantitatea zilnică de care are nevoie un organism uman în anumite împrejurări este nevoie de cantități mari de astfel de fructe, motiv pentru care se recurge de regulă la extracție și concentrarea în diverse suplimente alimentare sau pentru obținerea de medicamente.

Brevetul CN 102320934/2012 descrie o metodă de extracție a resveratrolului din *Polygonum cuspidatum*, prin extracție cu amestec de solvenți apă:etanol (metanol) la un raport materie primă: solvent de 1:8-1:20 (m/v). Extracția s-a realizat în 3 trepte, timp de 1-2h la temperatura de 50°C-85°C. Extractul concentrat, prin îndepărtarea solventului prin distilare la vid, s-a supus hidrolizei acide, timp de 3 h la 50°C-80°C. Peste amestecul hidrolizat răcit, s-a adăugat soluție alcalină până la pH neutru. Puritatea resveratrolului extras a fost între 50,5-52,3%. Procedeu de extracție este unul simplu însă dezavantajul constă în utilizarea unei cantități mari de solvent și utilizarea acizilor pentru realizarea hidrolizei.



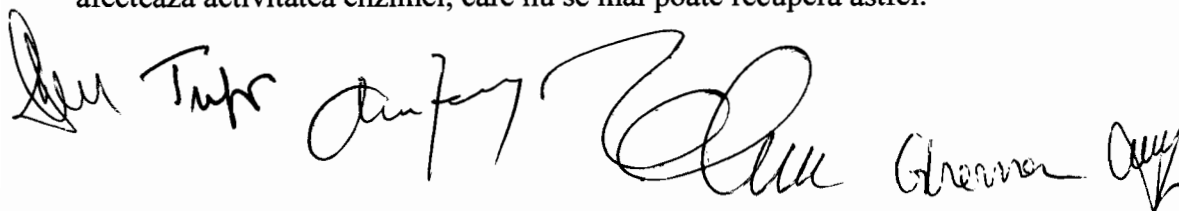
Aceași sursă de resveratrol: plantele *Polygonum cuspidatum*, este sugerată și de metoda de extracție descrisă în **Brevetul CN1724495A/2006**. Extracția resveratrolului se realizează prin metoda asistată de ultrasunete, folosind ca și solvent de extracție etanol, urmată de recuperarea resveratrolului printr-o a doua extracție în acetat de etil. Separarea resveratrolului se realizează prin metoda cromatografică, folosind ca și fază staționară o coloană cu umplutură de celuloză. Metoda descrisă prezintă ca și dezavantaj pierderile mari de produs util, datorită etapelor successive de extracție.

Brevetul CN1962592A/2007 descrie o metodă de izolare și purificare a resveratrolului și a glucosidei resveratrolului din *Polygonum cuspidatum*. Procedura de obținere presupune următoarele etape: extracția cu etanol, pre-separarea pe o coloană umplută cu rășini macroporoase, urmată de purificarea prin metoda cromatografică în contracurent. Dezavantajul metodei constă în utilizarea unei cantități mari de solvent organic, timp îndelungat al operațiilor și costuri ridicate cu regenerarea rășinilor macroporoase, și necesitatea folosirii mai multor coloane în baterie, ceea ce va mări costurile investiției

O metoda de creștere a a randamentului de extracție a resveratrolului din plantele *Polygonum cuspidatum* este descrisă în **Brevetul CN1513822A/2004**. Metoda presupune utilizarea unor microorganisme special adăugate pentru a îmbunătăți bioconversia conținutului de resveratrol. Extracția are loc prin metoda asistată de microunde, folosind ca și solvent de extracție un amestec de 40% etanol și 4-metil-2-pentanol. Deși prezenta invenție își propune simplificarea procesului de operare, scurtarea ciclului de producție și reducerea costurilor, totuși tehnologia de extracție cu microunde este limitată la operațiile la nivel de laborator

Brevetul CN1513823A/2004 prezintă un proces de obținere a resveratrolului utilizând CO₂ supercritic ca și solvent de extracție, în amestec cu etanol și 2-propanol. Acest proces are un ciclu de producție scurt cu consum redus de solvenți, randament ridicat și costuri reduse. Totuși, tehnologia de extracție cu CO₂ supercritic la nivel industrial prezintă dezavantajul unei investiții mari datorită complexității instalației de recuperare și recirculare a CO₂-lui .

Brevetul CN102070410/2011 descrie o metodă enzimatică combinată cu microunde pentru extragerea resveratrolului din rizomul de *Polygonum cuspidatum*. Metoda presupune utilizarea unei soluții de 80% etanol ca solvent de extracție, într-un raport masic solvent-material de 20:1, adăugarea a 10 mg de celuloză pentru enzimoliză în condițiile de extracție enzimatică optimă și anume la temperatura de 50°C și valoarea pH-ului 5, timp de 30 de minute, prin tratare cu microunde. Metoda prezintă avantajul scurtării timpului de extracție, însă tratamentul cu microunde afectează activitatea enzimei, care nu se mai poate recupera astfel.



Brevetul DE 102007011676A1/ 2007 extrage din frunzele și rizomii sortului de plantă *Fallopia* cu numele *Igniscum* sau *hibrizi* ai ei resveratrolul și derivații lui. Extracția are loc imediat după recoltare în faza verde. Planta și rizomii se macină și se presează iar împreună cu sucule de presare se supune extracției, care are loc în mediu alcoolic, de acid acetic sau cu CO₂.

Brevetul EP 2310026 A2/2008 extrage resveratrolul și derivații lui, din rizomii și rădăcinile plantei din *Fallopia* cu numele *Candy* pe care apoi îi separă fără a se preciza mai multe amănute. Se cunoaște că se fac extracte alcoolice, cu acid acetic și CO₂. Pentru a măria concentrația de resveratrol și omologii lui, înainte de recoltarea frunzelor și rizomilor cu 1-30 zile, se supune cultura de plante *Fallopia(Candy)* unui stres prin expunerea la lumina UV și reducerea udatului.

Există de asemenea numeroase brevete care descriu utilizarea derivaților resveratrolului, purificați mai mult sau mai puțin prin metodele prezentate, de la suplimente alimentare până la medicamente, în tratamentul unui spectru larg de boli sau pentru aplicații în cosmetică, îngreșămite, ierbicide, sau realizarea a diverselor băuturi răcoritoare sau preparate alimentare, etc.

În industria noastră accesul la materia primă vegetală cu conținut de resveratrol ridicat este cel mai facil pentru materialul vegetal rezultat ca produs secundar din procesul de vinificație și culturile vinicole. În funcție de sursa de materie primă se pot utiliza produsele secundare de la cultivarea viței de vie sau cele provenite din vinificație ca material uscat, material proaspăt sau material congelat.

Invenția propusă se referă numai la extracția din *Vitis vinifera L.* și elimină dezavantajele tehnologiilor prezentate mai sus, combinând anumite operații pentru a fi adaptate tuturor condițiilor de livrare a subproduselor din viticultură și vinificație.

Problema tehnică care o rezolvă invenția este elaborarea unui procedeu de obținere a concentratelor de polifenoli și purificarea și izolarea avansată a resveratrolului din mlădițele, piețița boabelor de struguri și a sâmburilor precum și din tescovina rezultată din procesul de vinificație. În funcție de felul în care sunt furnizate aceste subproduse se procedează după cum urmează :

Pentru mlădițe (vrejuri):

- mărunțirea centrifugală a mlădițelor, presarea acestora, extragerea cu alcool a polifenolilor din sucule obținut și purificarea acestui extract.

-șrotul de presare se supune macerării alcoolice, se separă extrasul alcoolic prin filtrarea centrifugală de masă de extract , faza lichidă trecand la concentrarea și purificare la vid.



Pentru tescovină:

- separarea hidraulică pe ciururi vibratoare și colectarea separată a subproduselor, apa de spalare se recirculă

- mărunțirea centrifugală a pielițelor, după care se procedează identic ca și la mlădițe

Pentru sâmburii de struguri:

- se usucă în camere de uscare la temperatura de maxim 65°C la o umiditate remanentă de < 1%

- se presează pentru extragerea uleiului de sâmburi de struguri, iar șrotul rezultat se trimite la extracția în alcool

-extracție la temperatura 75 - 80°C

-se filtrează centrifugal rezultând o soluție etanolică

-se distilă la sec pentru reciclarea alcoolului

-se redizolvă în apă

-se adaugă β – glucozidază pe suport ferromagnetic

-se hidrolizează la 45°C

-se separă în câmp magnetic enzima

-se supune extracției cu solvent nemiscibil cu apa

-se separă fazele și se repetă extracția în solvent

-se spală alcalin

- se decolorează cu pământ decolorant

-se filtrează centrifugal

-se distilă în vid

-se usucă la aer

Pentru pielițele de boabe de struguri :**- separate hidraulic**

-marunțire centrifugală

-presare (ca și la mlădițe)

-extragere cu alcool a sucului obținut

-turta se prelucrează în continuare împreună cu sâmburii de struguri

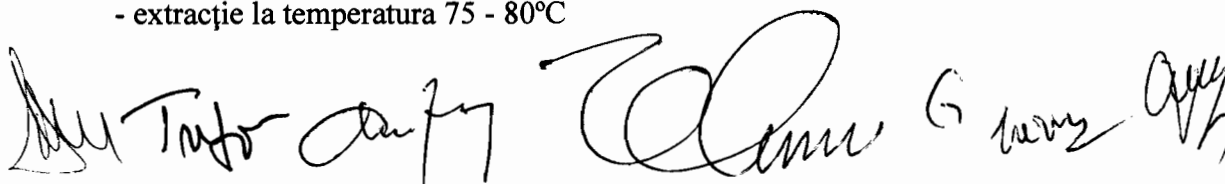
-extragerea cu alcool a polifenolilor (ca și la mlădițe)

-purificarea acestui extract

- faina uscata :

- se amestecă faina cu alcool etilic

- extracție la temperatura 75 - 80°C



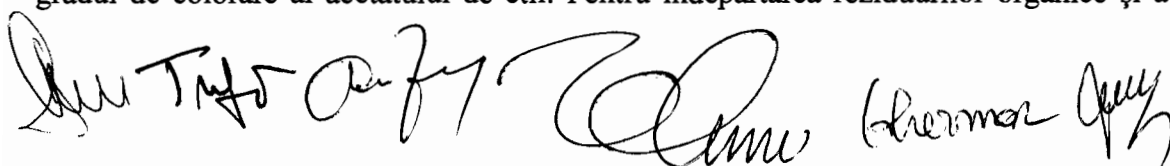
- se filtrează centrifugal rezultând o soluție etanolică
- se distilă la sec pentru reciclarea alcoolului
- se redizolvă în apă
- se adauga β – glucozidază pe support ferromagnetic
- se hidrolizează la 45°C
- se separă în câmp magnetic enzima
- se supune extracției cu solvent nemiscibil cu apa
- se separă fazele și se repetă extracția în solvent
- se spală alcalin
- se decolorează cu pământ decolorant
- se filtrează centrifugal
- se distilă în vid
- se usucă la aer

La fel se poate proceda cu măcinătura vrejurilor sau a rădăcinilor spălate de *Vitis vinifera* adulte.

Pentru ilustrarea realizării invenției se descrie succesiunea operațiilor tehnologice a obținerii compușilor polifenolici și a resveratrolului pur. În cele ce urmează vom prezenta un exemplu de extracție de resveratrol din faina uscată de pieleță de boabe de *Vitis vinifera* și unul din sucii mlădițelor sau frunzelor aceleiași specii.

Exemplul nr 1.

Materia primă se dispersează în alcool etilic, la un raport de materie primă 1/3-până la 1/6. Se încălzește la temperatura de reflux, de 75-80°C și se menține la această temperatură timp de 1h. După expirarea timpului, amestecul se golește din reactor și se filtrează, pe un filtru cu diametrul porilor de 12-20 μ m. Soluția etanolică se distilă la sec pentru recuperarea alcoolului. Extractul rezultat pulbere maro-verzui, care este prelucrat în continuare. Extractul alcoolic obținut după îndepărtarea etanolului, se dispersează în apă, într-un raport extract/apă de 1/30 și se supune hidrolizei enzimatică pentru recuperarea resveratrolului și din polidatină. Soluția apoasă, se aduce la pH 4,5 cu o soluție de acid ascorbic și se hidrolizează cu β - glucozidază, depusă pe suport feromagnetic, timp de 2 zile la 45°C. După hidroliză, următoarea etapă principală este extracția resveratrolului într-un solvent nemiscibil cu apa. Peste soluția hidrolizată și filtrată se adauga acetat de etil la un raport volumic soluție apoasă /solvent organic de 1/1. Se agită amestecul, pentru realizarea unui contact cât mai intim între faze, iar apoi se separă fazele.,Operația se repetă de 2-3 ori, în funcție de gradul de colorare al acetatului de etil. Pentru îndepărtarea reziduurilor organice și a compușilor



solubili în apă, se spală faza organică cu o soluție alcalină (de pH 8-9, de 5% NaHCO_3), până când faza apoasă nu se mai colorează. Extractul de acetat de etil cu resveratrol, se pune într-un pahar de laborator și se adaugă 2% Tonsil pentru decolorarea soluției. Amestecul se agită timp de 40 minute, la temperatura camerei, iar eficiența decolorării se urmărește prin măsurarea absorbției la 650nm. Absorbția soluției finale trebuie să scadă cu cel puțin 90% față de cea a soluției inițiale. Dacă nu se reușește decolorarea se crește concentrația de Tonsil până la 5%. Amestecul se filtrează pe un filtru cu diametrul porilor de 12-20 μm , iar îndepărtarea solventului prin distilare în vid, la 40°C și o presiune de 200 mm Hg, până la un volum cu 10% > decât volumul necesar pentru solubilizarea resveratrolului în solvent. Peste extractul concentrat de resveratrol astfel obținut, se adaugă apă distilată, într-un raport extract/apă de până la 0,02. Se observă cum se formează flocoane de resveratrol datorită desolubilizării resveratrolului. Soluția se filtrează pe un filtru cu diametrul porilor de 0,45 μm , iar cristalele rezultate, au culoare alb gălbui și se usucă la aer. Concentrația în resveratrol a cristalelor este de minim 90%. Randamentul de extracție a total polifenolilor este de 66,67%.

Exemplul nr.2

Materia primă care este utilizată este constituită din mlădițele tinere înfrunzite care se elimina la tăierea din mai-iunie a culturilor de viță de vie sortimentul roșu, albastru sau negru. Mlădițele sunt măcinate cu mori centrifugale. Din această măcinătură se iau de exemplu 260g care se introduc într-o presă cu șnec. La baza presei se elimină prin orificiile de scurgere suc format prin presarea frunzelor, tulpinilor verzi nelignificate. Pe axul șnecului de presare se elimină o pastă fibroasă aproape uscată. Cantitatea rezultată de suc depinde de stadiul vegetației și de umiditatea conținută în materialul vegetal. S-a obținut 120g suc și 130g deșeu celulozic de presare cu o umiditate remanentă după filtrare de 15-50 %. Conținutul materialului celulozic este în proporție de 30% - 60% Umiditatea remanentă a materialului presat este de aproximativ 48,6 %. Sucul se amestecă cu 500ml (391g) etanol și se supune extracției la 78°C timp de 1 h după care se filtrează rezultând un precipitat de insolubil în alcool (10,4g) care se îndepartează. Extractul alcoolic se supune distilării în vid rezultând o cantitate de 12,2 g extract alcoolic de polifenoli bruți. Se adaugă peste cele 12,2g de polifenoli, 50ml apă și 2ml HCl de 37% . Se supune acest amestec hidrolizei enzimatică cu β -glucozidază depusă pe suport feromagnetic timp de 72 h. Se îndepartează în câmp magnetic catalizatorul de hidroliză și se analizează rezultatul. Extractul arată o concentrație de 0,28 % trans-resveratrol ce corespunde unei conversii a polidatinei în resveratrol de 63,06%. Puritatea resveratrolului atinge 99,8%.

[Handwritten signatures]

În figura 1 este prezentată cromatograma HPLC a amestecului de polifenoli înainte de începerea hidrolizei și la terminarea acesteia și după extracția cu solvent nemiscibil cu apa.

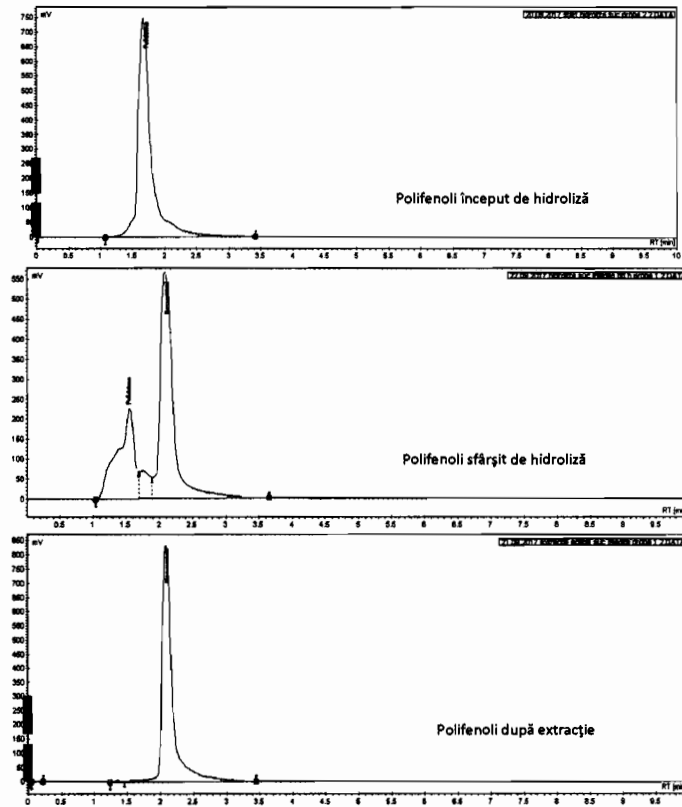


Figura 1. Cromatograma polifenoli. $R_t=1,7$ – polidatină; $R_t= 2,2$ -trans-resveratrol

[Handwritten signatures]

REVENDICĂRI

1 - Procedeu de obținere a unui concentrat de polifenoli cu component activ principal trans resveratrol caracterizat prin aceea că extracție biochimică din toate partile plantei Vitis vinifera, în special speciile roșii, negre sau albastre.

2 -Procedeu de obținere a unui concentrat de polifenoli conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că folosește enzima β - glucozidază pe suport feromagnetic cu scopul de a facilita transformarea polidatinelor în resveratrol și a permite recuperarea facilă a biocatalizatorului enzimatic. Tratament enzimatic 40-45°C, pH 4 - 6 și un timp de hidroliză de 12-24h urmată de o extracție alcoolică la reflux timp de 1 la 70-80°C.

3-Procedeu de obținere a unui concentrat de polifenoli conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că folosește pentru decolorarea extractului pământuri decolorante , Tonsil, Bentonite , etc

The bottom of the page contains several handwritten signatures and initials in black ink. From left to right, there is a signature that appears to be 'Dan Todor', followed by 'Anufy', a large stylized signature 'Edmu', and 'Gherman' with 'Jury' and 'VH' written to its right.