



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00766

(22) Data de depozit: 09/12/2021

(41) Data publicării cererii:
30/06/2023 BOPI nr. 6/2023

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
CHIMIE ȘI PETROCHIMIE - ICECHIM,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.202,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• OANCEA FLORIN, STR.PAȘCANI NR.5,
BL.D 7, SC.E, ET.2, AP.45, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;

• CONSTANTINESCU-ARUXANDEI DIANA,
ȘOS.MIHAI BRAVU NR.297, BL.15A, SC.A,
AP.5, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• TRITEAN NAOMI, STR.
PERFEȚIONĂRII, NR.11, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• DIMITRIU LUMINIȚA, ALEEA BARAJULUI
BICAZ, NR.9, BL.M31, SC.B, ET.2, AP.408,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• DEȘLIU-AVRAM MĂLINA, STR. GÂRLENI
NR. 4, BL. C85, SC. A, ET. 6, AP. 40,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• GHEORGHE DENISA-IOANA,
ALEEA IEZERULUI, NR.4, BL.133, SC.D,
ET.1, AP.7, PLOIEȘTI, PH, RO

(54) COMPOZIȚIE SINERGICĂ DE POLIFENOLI ȘI PROCEDEU
DE OBTINERE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unei compoziții sinergice de polifenoli pentru realizarea unor produse bioactive destinate îngrijirii pielii și tratamentul mucoaselor. Procedeu, conform invenției, constă în etapele: măcinare a materialului vegetal, substrat epuizat de la cultivarea ciupercilor din genul Pleurotus, adăugare a unei soluții de etanol 50%, extracția în contracurent solid-lichid, separarea materialului vegetal extras, adăugarea unei soluții de enzime, extragerea asistată enzimatic a materialului vegetal, inactivarea enzimelor, adăugare de NaOH pentru extracția totală a

acizilor hidroxicinamici, reluarea rezidului sec într-o soluție de etanol 50%, determinarea concentrației de flavonoide totale și de acizi hidroxicinamici, amestecarea în raport o parte flavonoide la 2 părți acizi hidroxicinamici și uscarea lor la sec, rezultând o compoziție care prezintă o activitate antioxidantă de captare a radicalului 2,2-difenil-1-picrililhidrazil (DPPH) de cel puțin 2,8 mg echivalent Trolox per g extract.

Revendicări: 3

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



COMPOZIȚIE SINERGICĂ DE POLIFENOLI ȘI PROCEDEU DE OBTINERE

Prezenta invenție se referă la o compoziție sinergică de polifenoli, pe bază de acid ferulic și/sau acizi hidroxicinamici înrudiți și flavonoide, pentru realizarea de produse bioactive destinate îngrijirii pielii și tratamentului mucoaselor, ca și la un procedeu de obținere a acestei compoziții.

Sunt cunoscute diferite compoziții sinergice pe bază de acid ferulic și/sau acizi hidroxicinamici înrudiți și flavonoide și, eventual, alte ingrediente. Brevetul KR 102182794 B1 prezintă o metodă de obținere a unei compoziții de resveratrol și acid ferulic prin emulsifiere ultrasonică și injecție de gaz sub presiune.

Brevetul US 9072919 B2 descrie o compoziție cosmetică apoasă de îngrijire a pielii care cuprinde apă și (a) aproximativ 0,1% până la aproximativ 10% din cel puțin un flavonoid selectat din grupul constând din baicalină și taxifolin; (b) aproximativ 0,1% până la aproximativ 10% acid ferulic; (c) aproximativ 0,1% până la aproximativ 10% din cel puțin un antioxidant suplimentar selectat din grupul constând din Vitamina C și resveratrol; și (d) aproximativ 0,1% până la aproximativ 10% din cel puțin un hidrotrop selectat din grupul constând din cofeină și nicotinamidă. Componentele (a) până la (d) se află în rapoarte sinergice pentru a produce activitate antioxidantă sinergică.

Cererea de brevet WO2020104533A1 se referă la utilizarea unei compoziții care include compuși bioactivi extrași din *Vitis vinifera* și *Vaccinium angustifolium*, amestecul cuprinzând: cel puțin 1% catehine și / sau epicatehine, procentul fiind raportat la greutatea totală a amestecului; sunt considerate necesare cel puțin 5 ppm (părți per milion în amestec) de acid ferulic și cel puțin 200 ppm de resveratrol, ca doză unică la oameni sau animale, pentru a îmbunătăți sau a menține funcțiile cognitive.

În general compozițiile sunt obținute prin extragerea diferitelor substrate vegetale, purificarea avansată a ingredientelor și apoi recombinația lor în diferite proporții. De exemplu acidul ferulic și/sau acizii hidroxicinamici înrudiți, una din componentele compozițiilor sinergice care conțin și resveratrol, este extras din diferite substrate vegetale. Cererea de brevet WO2021011810 A1 prezintă un proces pentru extracția reactivă și purificarea ulterioară a moleculelor organice din biomasă, care include extragerea unuia sau mai multor produse din biomasă folosind un solvent de extracție pentru a solvata produsele, contactarea biomasei cu un reactant în timpul extragerii, recuperarea unuia sau mai multor produse, efectuarea de ultrafiltrare pentru îndepărtarea impurităților din unul sau mai multe produse pentru a produce un extract filtrat, extragerea uleiurilor din extractul filtrat folosind adsorbția pentru a produce un

extract degresat, efectuarea trans-esterificării sau hidrolizei extractului degresat și efectuarea purificării prin adsorbție a acidului ferulic, acidului cumaric, ferulatului sau cumaratului sau o combinație a acestora.

Brevetul EP2999687 B1 descrie un procedeu de extracție a acidului ferulic prezent într-o fază apoasă, obținut prin tratarea a cel puțin unui material vegetal și care conține, de asemenea, polizaharide, procesul menționat cuprinzând cel puțin următoarele etape: 1) tratamentul respectivului material vegetal urmat de o separare solid / lichid pentru a recupera o fază solidă și o fază lichidă apoasă cuprinzând acidul ferulic și respectivele polizaharide, 2) tratamentul fazei lichide menționate pentru a separa selectiv, pe de o parte, polizaharidele și, pe de altă parte, acid ferulic prezent într-o fracție apoasă, 3) concentrația fracției apoase menționate care conține acidul ferulic astfel încât să recupereze un flux concentrat de acid ferulic, 4) recuperarea acidului ferulic sub formă solidă.

Dezavantajul acestor procedee care urmăresc purificarea componentelor și apoi recombinația lor este dat de faptul că distrug sisteme complexe în încercarea de a le reconstitui. Un produs complex este mai mult decât suma părților sale componente, datorită caracteristicilor emergente, adică "comportamente neașteptate care rezultă din interacțiunea dintre componentele unei aplicații și mediul lor" (Johnson, 2006). Cea mai cunoscută proprietate emergentă este sinergia, adică îmbunătățirea reciprocă a activităților biologice ale diferitelor ingrediente biologic active. În general, componentele extrase sunt mai active în combinațiile lor naturale față de compușii extrași. Exemplele ilustrative de produse complexe sunt medicamentele utilizate în medicina chineză. De exemplu, în cazul produsului ShenKang, s-a demonstrat existența unei combinații sinergice de polifenoli (Xu et al., 2017).

Pentru a menține rapoartele existente în materialele naturale cererea de brevet RO135149 A0 prezintă un procedeu alcătuit din următoarele etape: măcinarea umedă a materialului vegetal, determinarea activității antioxidante de captare a radicalului 2,2-difenil-1-picrililhidrazil (DPPH), față de care se dozează un amestec de enzime de extracție format din pectinază și feruloil-esterază, ultrasonicare repetată a substratului vegetal cu enzime, urmată de extracția sub-critică în contra-curent, separarea materialului vegetal de extractul alcoolic și concentrarea până la 35% substanță uscată cu recuperarea etanolului, din care rezultă un extract având un conținut minim de 2,7 g resveratrol, 12,2 g acizi hidroxicinamici totali și 18,3 g oligozaharide pectice la 100 ml extract etanolic concentrat și o activitate antioxidantă de captare a radicalului DPPH de cel puțin 3,5 mg echivalent Trolox per g extract.

Dezavantajul acestui procedeu este că este aplicabil doar combinațiilor de compuși cu solubilitatea ridicată în medii apoase.

Acizii hidroxicinamici au atât aplicații cosmeceutice (Taofiq, González-Paramás, Barreiro, & Ferreira, 2017), cât și aplicații nutraceutice (Silva & Batista, 2017). Efectele lor benefice depind însă de biodisponibilitatea lor, dependentă și de solubilitatea / dispersabilitatea lor în apă (Liu et al., 2020). Și în cazul flavonoidelor activitatea biologică depinde de creșterea solubilității și/sau a dispersibilității lor în apă (Goncalves et al., 2015),

Prezenta invenție se referă la o compoziție sinergică, pe bază de acid ferulic și/sau acizi hidroxicinamici înrudiți și flavonoide, care este obținută printr-un procedeu care să asigure o bună dispersabilitate și care să nu implice separarea și purificarea avansată a principalelor componente și apoi recombinația lor.

Compoziția de polifenoli sinergici conține 2,4 grame de flavonoide totale, exprimate ca echivalent quercitină și 7,2 grame de acizi hidroxicinamici totali, exprimați ca echivalent acid clorogenic, și are o activitate antioxidantă de captare a radicalului DPPH, 2,2-difenil-1-picrililhidrazil, de cel puțin 2,8 mg echivalent Trolox per g extract.

Procedeul de obținere a compoziției de mai sus este alcătuit din următoarele etape:

- ✓ Măcinarea materialului vegetal, substrat epuizat de la cultivarea ciupercilor din genul *Pleurotus*, până la dimensiuni de 0,5 mm;
- ✓ Aducerea peste materialul vegetal măcinat a unei soluții de etanol 50%, în raport de 1 litru etanol 50% la 100 g material vegetal măcinat și extracția în contracurent solid-lichid pe un extractor de fluide subcritic, operat la 8 bari, la temperatura de 45°C, timp de 3 ore;
- ✓ Separarea materialului vegetal de extractul alcoolic prin filtrare pe filtru cu plăci;
- ✓ Aducerea peste materialul vegetal extras a 1000 ml apă și a unui amestec de enzime, alcătuit din hidrolaze care acționează asupra polizaharidelor din peretele celular, urmată de extragerea asistată enzimatic a materialului vegetal în apă, timp de 12 ore la temperatura de 55°C și pH 6.0;
- ✓ Inactivarea enzimelor, răcirea materialului vegetal și adăugarea de hidroxid de sodiu până la atingerea unei concentrații de 1M pentru extracția totală a acizilor hidroxicinamici din matricea extracelulară lignocelulozică, prin agitare la temperatura camerei și la 100 rpm timp de 2 ore;
- ✓ Extracția acizilor hidroxicinamici în acetat de etil, aplicat în raport de minim 1 ml acetat de etil la 1 ml de dispersie apoasă, timp de 10 min, la temperatura camerei;

✓ Separarea soluției de acetat de etil, evaporarea ei la sec sub vid, cu recuperarea acetatului de etil și reluarea rezidului sec într-o soluție de etanol 50°C, în raport de 1 gram reziduu la 100 ml etanol;

✓ Determinarea concentrației de flavonoide totale din primul extract alcoolic și a conținutului de acizi hidroxicinamici totali în cel de-al doilea extract, amestecarea lor în proporție de 1 parte flavonoide la 2 părți acizi hidroxicinamici și uscarea lor la sec.

In cadrul procesului de mai sus detaliile specifice sunt următoarele.

Amestecul de enzime care acționează asupra polizaharidelor din peretele celular este alcătuit din pectinază, β -glucanază și beta-glucozidază, dozate ca 2500 unități pectinazice, 75 unități β -glucanazice și 100 unități beta-glucozidazice la 1 kg material vegetal supus extracției.

Prezenta invenție prezintă următoarele avantaje:

✓ Permite formarea unei compoziții sinergice datorită biodisponibilității crescute ca urmare a efectului hidrotrop al ferulatului de sodiu format în timpul extracției alcaline

✓ Eliberează cantități semnificative de acid ferulic / acizi hidroxicinamici din materialul vegetal ca urmare a activității specifice a amestecului de enzime;

✓ Extrage și concentrează ingredientele active care acționează sinergic fără a mai fi nevoie de separarea compușilor, purificarea lor avansată și apoi recombinația lor

In continuare se prezintă un exemplu de realizare care ilustrează invenția fără a limita domeniul ei de aplicare.

Exemplul 1. Materialul vegetal uscat, substrat epuizat de la cultivarea ciupercilor din genul *Pleurotus*, este măcinat pe o moară cu cuțite (Willey model 4, Thomas, Thermo Fischer, Waltham, MA, SUA), prevăzută cu o sită de 0,5 mm. 100 g de substrat epuizat măcinat este adăugat în vasul de extracție de 2 litri al unui extractor sub-critic contra-curent (Timatic Micro, Spello, Italia). Peste cele 100 grame pulpă se adaugă 1 litru de alcool etilic. Materialul vegetal este supus extracției în contracurent, prin închiderea capacului extractorului și conectarea lui la compresorul de aer, etanșarea tuturor conexiunilor și extracția în contracurent solid-lichid în condiții subcritice, date de operarea la 8 bari și la temperatura de 45°C, timp de 3 ore. Materialului vegetal extras se separă de extractul alcoolic prin filtrare pe filtru cu plăci. Se concentrează extractul etanolic, până la 35% substanță uscată, cu recuperarea etanolului, pe un evaporator rotativ sub vid (Rotavapor® R-300, Buchi, Flavil, Elveția).

Materialul vegetal extras se trece într-un balon de reacție cu trei găuri. Se aduc peste materialul vegetal 1000 ml apă pură. Peste cele 100 grame de material vegetal extras se aduce un amestec de enzime care conține 250 unități pectinazice (PNGU),

7,5 unități β -glucanazice (BGUX) și 10 unități beta-glucozidazice. Se continuă extragerea asistată enzimatic a materialului vegetal în apă, timp de 12 ore la temperatura de 55°C și pH 6.0.

Un exemplu de amestec de enzime comerciale care se poate folosi pentru procesul de extracție de mai sus este Vinotaste Pro (Novozyme, Bagsværd, Danemarca), care este un amestec complex de enzime litice, produs de tulpini selectate de *Trichoderma harzianum* și *Aspergillus niger*, și care are o activitate pectinazică de 2500 unități pectinazice (PNGU) și activitate exo- β -(1,3)-glucanazică (EC3.2.1.56) și endo- β -(1,3)-glucanazică (EC 3.2.1.6) de 75 unități glucanazice (BGUX) per gram. 1 unitate pectinazică PNGU este definită ca acea cantitate de enzimă care eliberează 1,0 μ mol de acid galacturonic din acid poligalacturonic pe oră la pH 4,0 și 25°C. O unitate glucanazică BGUX este definită ca fiind cantitatea de enzimă necesară pentru a produce 1 μ mol de glucoză pe minut dintr-o soluție care conține 2,5 g/l laminarină, la pH 5,5 și la temperatura de 45°C. Un alt preparat enzimatic, de beta-glucozidază (EC 3.2.1.21) din drojdii de vinificație, care se folosește este Zymovarietal Aroma (Sodinal, București, România). Acest preparat are o activitate de 100 unități beta-glucozidazice per gram de preparat. O unitate beta-glucozidazică este definită ca fiind cantitatea de enzimă necesară pentru eliberarea a 1 μ mol de p-nitrofenol pe minut din p-nitrofenil- β -D-glucopiranozid (pNPG) (5 mM) în tampon 100 mM acetat de sodiu, pH 4,5 la 23°C. Se poate folosi orice fel de amestec similar de preparate enzimatice, cu aceleași caracteristici, un astfel de cocktail enzimatic acționând asupra pereților celulari vegetali.

După 12 ore se încălzește materialul vegetal până la 90°C, se menține timp de 5 min pentru inactivarea enzimelor, și se răcește materialul vegetal la temperatura camerei. Se adaugă 500 ml de hidroxid de sodiu 3 M peste cei 1000 ml de mediu apos, până la atingerea unei concentrații de 1 M și se menține sub agitare timp de 2 ore la temperatura camerei pentru extracția totală a acizilor hidroxicinamici din matricea extracelulară lignocelulozică.

Cei 1500 ml de extract alcalin se extrag în porții de câte 250 ml cu câte 250 ml de acetat de etil. Se agită în pâlnie de separare de 1 litru timp de 10 min, la temperatura camerei. Se separă stratul apos de cel de acetat de etil. Soluțiile de acetat de etil se reunesc și se concentrează la sec pe un evaporator rotativ sub vid (Rotavapor® R-300, Buchi, Flavil). Rezultă 0,56 grame de reziduu, care se reiau în 56 ml alcoolic etilic 50%

În primul extract alcoolic se determină concentrația de flavonoide totale, prin metoda de complexare a aluminiului (Pękal & Pyrzyńska, 2014). În cel de-al doilea extract alcoolic se determină acizii hidroxicinamici liberi, cu ajutorul sistemului

cromogen HCl-NaNO₂-Na₂MoO₄-NaOH (Štefan, Vuković Rodríguez, Blažeković, Kindl, & Vladimir-Knežević, 2014). Se amestecă în proporție de 1 parte flavonoide la 3 părți acizi hidroxicinamici. În extract se determină activitatea anti-oxidantă de captare a radicalului DPPH, 2,2-difenil-1-picrililhidrazil printr-o metodă cunoscută (Sharma & Bhat, 2009) și se exprimă ca echivalent Trolox per g extract. Extractul se usucă prin liofilizare și se depozitează în sticlă brună la frigider.

Compoziția de extract vegetal sinergic conține 2,4 grame de flavonoide totale, exprimate ca echivalent quercitină și 7,2 grame de acizi hidroxicinamici totali, exprimați ca echivalent acid clorogenic, și are o activitate antioxidantă de captare a radicalului DPPH, 2,2-difenil-1-picrililhidrazil, de cel puțin 2,8 mg echivalent Trolox per g extract.

Compoziția are un efect de stimulare a reparării celulare și un efect anti-microbian față de microorganismele care produc filme disbiotice pe mucoase.

Revendicări

1. Compoziția de polifenoli sinergici conform invenției **caracterizată prin aceea că** are un conținut de 2,4 grame de flavonoide totale, exprimate ca echivalent quercitină și 7,2 grame de acizi hidroxicinamici totali, exprimați ca echivalent acid clorogenic, și are o activitate antioxidantă de captare a radicalului DPPH, 2,2-difenil-1-picrililhidrazil, de cel puțin 2,8 mg echivalent Trolox per g extract.
2. Procedeu de obținere a compoziției conform invenției **caracterizat prin aceea că** este alcătuit din următoarele etape: măcinarea materialului vegetal, substrat epuizat de la cultivarea ciupercilor din genul *Pleurotus*, până la dimensiuni de 0,5 mm; aducerea peste materialul vegetal măcinat a unei soluții de etanol 50%, în raport de 1 litru etanol 50% la 100 g material vegetal măcinat și extracția în contracurent solid-lichid pe un extractor de fluide subcritic, operat la 8 bari, la temperatura de 45°C, timp de 3 ore; separarea materialului vegetal de extractul alcoolic prin filtrare pe filtru cu plăci; aducerea peste materialul vegetal extras a 1000 ml apă și a unui amestec de enzime, alcătuit din hidrolaze care acționează asupra polizaharidelor din peretele celular, urmată de extragerea asistată enzimatic a materialului vegetal în apă, timp de 12 ore la temperatura de 55°C și pH 6.0; inactivarea enzimelor, răcirea materialului vegetal și adăugarea de hidroxid de sodiu până la atingerea unei concentrații de 1M pentru extracția totală a acizilor hidroxicinamici din matricea extracelulară lignocelulozică, prin agitare la temperatura camerei și la 100 rpm timp de 2 ore; extracția acizilor hidroxicinamici în acetat de etil, aplicat în raport de minim 1 ml acetat de etil la 1 ml de dispersie apoasă, timp de 10 min, la temperatura camerei; separarea soluției de acetat de etil, evaporarea ei la sec sub vid, cu recuperarea acetatului de etil și reluarea rezidului sec într-o soluție de etanol 50°C, în raport de 1 gram reziduu la 100 ml etanol; determinarea concentrației de flavonoide totale din primul extract alcoolic și a conținutului de acizi hidroxicinamici totali în cel de-al doilea extract, amestecarea lor în proporție de 1 parte flavonoide la 2 părți acizi hidroxicinamici și uscarea lor la sec.
3. Procedeu de obținere a compoziției conform revendicării 2 **caracterizat prin aceea că** amestecul de enzime care acționează asupra polizaharidelor din peretele celular este alcătuit din pectinază, β -glucanază și beta-glucozidază, dozate ca 2500 unități pectinazice, 75 unități β -glucanazice și 100 unități beta-glucozidazice la 1 kg material vegetal supus extracției.