(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
22 novembre 2012 (22.11.2012)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2012/156917 A2

(51) Classification internationale des brevets :

A61K 8/34 (2006.01)	*A23L 1/30* (2006.01)
A61K 8/35 (2006.01)	*C07C 39/205* (2006.01)
A61K 8/40 (2006.01)	*C07D 307/80* (2006.01)
A61K 8/81 (2006.01)	*A61K 8/49* (2006.01)
A61K 8/97 (2006.01)	*A61K 31/05* (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01)	*A61K 31/343* (2006.01)
A61K 36/87 (2006.01)	*A61Q 19/00* (2006.01)
A23L 1/275 (2006.01)	*A61P 17/00* (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/IB2012/052444

(22) Date de dépôt international :
16 mai 2012 (16.05.2012)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
11/54395 19 mai 2011 (19.05.2011) FR

(71) Déposant *(pour tous les États désignés sauf US)* : **CAUDALIE** [FR/FR]; 6, Place de Narvik, F-75008 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants *(pour US seulement)* : **VERCAUTEREN, Joseph** [FR/FR]; 301, Chemin de Caylus, F-34170 Castelnau-le-Lez (FR). **SALMI, Cécile** [FR/FR]; 15, Rue du Maréchal Murat, F-34170 Castelnau-le-Lez (FR).

(74) Mandataires : **PEAUCELLE, Chantal** et al.; Cabinet Armengaud Aîné, 3, Avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR).

(81) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible)* : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés *(sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible)* : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclarations en vertu de la règle 4.17 :

— *relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))*

Publiée :

— *sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport (règle 48.2.g))*

(54) **Title** : METHOD FOR OBTAINING EPSILON-VINIFERIN AND/OR RESVERATROL AND CORRESPONDING PRODUCTS

(54) **Titre** : PROCEDE D'OBTENTION D'EPSILON-VINIFERINE ET/OU DE RESVERATROL ET PRODUITS CORRESPONDANTS

(57) **Abstract** : The invention relates to a method for obtaining purified ε-viniferin (Vf-Dry) and/or resveratrol which has a low content or is even free of ε-viniferin (Rv-Dry), from an extract, which is crude (EBPS), dry (EBPS-dry), or in solution (EBPS-Sol), of a plant material rich in stilbenoid polyphenols, characterized in that it comprises at least one cycle of adsorption-desorption on a solid substrate such as poly(vinylidene fluoride) or PVDF with EBPS-Sol, and/or partition of this EBPS-Sol solution with ethyl acetate. Applications in particular in the cosmetics industry and in therapy.

(57) **Abrégé** : L'invention se rapporte à un procédé d'obtention d'ε-viniférine purifiée (Vf-Sec) et/ou de resvératrol appauvri voire exempt en ε-viniférine (Rv-Sec), à partir d'un extrait, brut (EBPS), sec (EBPS-sec), ou en solution (EBPS-Sol) d'une matière végétale riche en polyphénols de type stilbénoïde, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un cycle d'adsorption-désorption sur support solide de type poly(fluorure de vinylidène) ou PVDF avec EBPS-Sol, et/ou une partition de cette solution EBPS-Sol avec l'acétate d'éthyle. Applications en particulier en cosmétique et en thérapeutique.

WO 2012/156917 A2

Procédé d'obtention d'epsilon-viniférine et/ou de resvératrol et produits correspondants

L'invention se rapporte à un procédé d'obtention d'epsilon-viniférine (ε-viniférine ci-après) purifiée et/ou de resvératrol appauvri en, voire exempt d'ε-viniférine, en particulier à partir d'un extrait, brut, sec (EBPS-Sec) ou en solution (EBPS-Sol), d'une matière végétale riche en polyphénols de type stilbénoïde. Elle se rapporte également aux produits obtenus.

Le resvératrol et ses oligomères présentent des propriétés anti-oxydantes de grand intérêt pour lutter contre le vieillissement, qui sont mises particulièrement à profit par la Demanderesse pour l'élaboration de compositions cosmétiques. En outre, l'action spécifique inhibitrice de l'ε-viniférine sur la tyrosinase permet de réduire les taches existantes sur la peau et de prévenir l'apparition de nouvelles taches.

Diverses sources végétales peuvent être utilisées pour obtenir du resvératrol et/ou de l'ε-viniférine. Certaines parties de plantes, notamment les sarments ou les rafles de vigne (*Vitis vinifera*), sont capables d'accumuler plus spécifiquement des polyphénols de type stilbénoïde (resvératrol et ses oligomères, dont l'ε-viniférine). Elles constituent donc des matières premières pour la préparation de tels extraits, dont les teneurs en ε–viniférine et/ou resvératrol oscillent entre 1 à 2% et jusqu'à 40%. L'extrait préparé à partir des racines de renouée du Japon (*Polygonum cuspidatum*), entre dans cette catégorie, mais ne renferme principalement que du resvératrol. À partir de ces extraits, il est possible de purifier les stilbénoïdes d'intérêt (voir notamment, l'article de Delaunay J.-C. et al, Preparative isolation of polyphenolic compounds from *Vitis vinifera* by centrifugal partition chromatography. *J. Chrom. A*, **2002,** 964, (1-2), 123-128).

Pour effectuer le dosage des différents stilbénoïdes présents dans ces extraits, par Chromatographie Liquide Haute Performance (CLHP) sur colonne de silice greffée C18 avec détection Ultra-Violet (UV), nous en préparons des solutions. Pour protéger les colonnes, celles-ci doivent d'abord être débarrassées de leurs particules solides, par passage au travers de filtres « compatibles » avec les solvants. Les inventeurs ont constaté que, pour une même solution, selon la nature du filtre utilisé, le pic correspondant à l'ε-viniférine pouvait refléter les teneurs évoquées ci-dessus, ou

disparaître parfois totalement du chromatogramme. C'est le cas, notamment, quand il s'agit du poly(fluorure de vinylidène) ou PVDF.

Ces observations ont été mises à profit pour rechercher les conditions d'un enrichissement des solutions en ε-viniférine.

La poursuite de ces travaux a montré qu'il était possible d'obtenir par extraction avec des solvants spécifiques des phases enrichies en ε-viniférine d'une part et des phases enrichies en resvératrol (Rv) d'autre part et d'opérer avec ou sans support solide de type PVDF.

L'invention a donc pour objet, selon un premier aspect, de fournir un procédé d'obtention d'ε-viniférine et/ou de resvératrol, mettant en œuvre du PVDF.

Elle a également pour but, selon un second aspect, de fournir un procédé d'obtention de phases enrichies en ε-viniférine et de phases enrichies en resvératrol (appauvri en, voire exempt d'ε-viniférine), par partition avec l'acétate d'éthyle de solutions aqueuses d'extraits végétaux bruts de polyphénols de type stilbénoïde (EBPS-Sol).

Elle vise également à fournir de l'ε-viniférine de pureté élevée et/ou du resvératrol appauvri en, voire exempt d'ε-viniférine, et leurs applications en cosmétique et en thérapeutique.

Dans la suite de la description et dans les revendications, on entend par :

- EBPS : un extrait brut végétal riche en polyphénols de type stilbénoïde,
- EBPS-Sec : l'EBPS obtenu à l'état sec par différents moyens (évaporation, lyophilisation,...),
- EBPS-Sol : la solution d'EBPS obtenue par solubilisation de l'EBPS-Sec ou obtenue directement à partir d'une matière végétale,
- Rv-Ads : la solution enrichie en resvératrol (Rv, ci-dessous) qui s'écoule lors de la phase d'adsorption sur le support solide d'une EBPS-Sol, selon le premier aspect,
- Rinc : les fractions obtenues lors du rinçage du support solide, selon le premier aspect,
- Vf-Des : la solution enrichie en ε-viniférine qui s'écoule lors de l'étape de désorption du support solide, après l'étape de rinçage, selon le premier aspect,

- P-Aqu : la phase aqueuse résultant de la partition d'une EBPS-Sol, selon le deuxième aspect,
- P-Org : la phase organique résultant de la partition d'une EBPS-Sol, selon le deuxième aspect,
- Vf-Sec: le concentrat obtenu par évaporation, lyophilisation des P-Aqu ou Vf-Des, constitué d'ε-viniférine purifiée,
- Rv-Sec : les résidus d'évaporation des Rv-Ads, Rinc et/ou P-Org constitués majoritairement de resvératrol et pouvant comprendre des oligomères du resvératrol autres que l'ε-viniférine.

Conformément à l'invention, le procédé d'obtention d'ε-viniférine purifiée Vf-Sec et/ou de Rv-Sec est caractérisé en ce qu'il comprend au moins un cycle d'adsorption-désorption sur support solide de type poly(fluorure de vinylidène) ou PVDF, avec l'EBPS-Sol et/ou une partition de cette solution avec l'acétate d'éthyle.

Le support PVDF utilisé est disponible sous diverses dénominations commerciales (Kynar®, Solef®, Floraflon®). Il s'agit toujours du perfluorure de vinylidène polymérisé (PVDF), donc possédant une grande inertie chimique. Le produit Kynar® tel que commercialisé se présente sous forme de poudre blanche, de densité de 1,78 g/cm^3 à 25°C.

Le PVDF est couramment utilisé pour filtrer des solutions et les débarrasser de leurs particules solides. Il a été observé dans quelques rares cas, une adsorption partielle de certains solutés, mais cette propriété n'a jamais été utilisée, à la connaissance des inventeurs, pour réaliser un enrichissement de lots de taille préparative. La sélectivité importante d'adsorption de la seule ε-viniférine est totalement inattendue et doit résulter de la structure particulière de ce dimère du resvératrol qui établit les interactions de type hydrophobes les plus fortes avec le polymère perfluoré.

Un enrichissement est observé dès le premier passage (voir figures 1 à 3). En soumettant l'extrait ainsi obtenu à un nouveau cycle d'adsorption-désorption (la même résine est avantageusement réutilisable sans perte d'activité, pour de nombreux cycles), le procédé permet d'obtenir l'ε-viniférine à l'état pratiquement pur.

L'extrait brut végétal désigné par EBPS-Sol, est obtenu avantageusement à partir de sarments de vigne, de préférence sous forme de poudre, par macération dans l'éthanol suivie d'une filtration. L'extrait brut végétal résultant est alors concentré et dissous dans l'eau, puis mis en œuvre dans le procédé de l'invention.

En variante, l'extrait brut végétal (EBPS) est directement dissous dans un solvant capable de solubiliser la totalité des constituants de l'extrait et ne permettant pas la désorption de l'ε-viniférine du PVDF, obtenant l'EBPS-Sol.

Ce solvant est constitué notamment, soit par de l'acétate d'éthyle seul, soit par un mélange formant une seule phase, dans lequel l'eau est majoritaire, mais qui comprend également un ou plusieurs solvants organiques, miscible(s) à l'eau.

Des solvants organiques idoines comprennent l'acétonitrile, l'acétone, et/ou le méthanol. Leur proportion, au total, représente 0,2 à 30%, le reste étant de l'eau (99,8 à 70%).

L'EBPS-Sol est soumis à une étape d'adsorption de l'ε-viniférine par filtration au travers du PVDF, lequel est rincé par plusieurs volumes du même solvant.

Les fractions obtenues, Rv-Ads et Rinc, sont rassemblées et concentrées par évaporation de la part organique, avantageusement sous pression réduite. S'il s'agit d'acétate d'éthyle seul, il est évaporé à siccité. Avec tout autre solvant, la solution aqueuse résiduelle, est séchée par lyophilisation et livre le resvératrol enrichi, Rv-Sec.

L'étape de désorption de l'ε-viniférine est réalisée à l'aide d'un solvant comportant, par rapport à l'eau, une plus grande, voire égale, proportion de solvant organique miscible à l'eau. Il s'agira par exemple d'un mélange acétonitrile-eau (95:5), acétone-eau (90:10), ou de méthanol-eau (50:50). Dans le cas où l'acétate d'éthyle est utilisé comme seul solvant dans l'étape d'adsorption, un solvant polaire sans eau sera avantageusement utilisé.

Les différents filtrats Vf-Des sont réunis et concentrés par évaporation de la part organique, avantageusement sous pression réduite. La phase aqueuse résultante est soumise à une lyophilisation et, dans le cas où l'acétate d'éthyle a été utilisé comme seul solvant dans la phase d'adsorption, à une évaporation à siccité, ce qui conduit, dans ces 2 cas, à un extrait sec enrichi en ε-viniférine Vf-Sec.

Selon le second aspect, les phases renfermant l'ε-viniférine purifiée P-Aqu et les phases enrichies en resvératrol P-Org sont obtenues par partition avec l'acétate d'éthyle, volume à volume, de la solution aqueuse d'EBPS-Sol.

La répétition du procédé sur les Vf-Des ou les P-Aqu, permet d'augmenter la richesse en ε-viniférine jusqu'à des taux pratiquement de 100%.

L'invention vise également, en tant que nouveaux produits, l'ε-viniférine et/ou le resvératrol tels qu'obtenus par les différentes dispositions du procédé défini ci-dessus.

L'ε-viniférine se distingue de celles précédemment décrites dans l'art antérieur par une pureté supérieure à 77% en masse et pouvant atteindre pratiquement 100%, par combinaison des différentes dispositions du procédé. En particulier, elle ne contient plus ou pratiquement plus les autres oligomères de resvératrol, initialement présents dans les extraits végétaux utilisés. Elle est également caractérisée par une activité inhibitrice de la tyrosinase au moins 4 fois plus forte que celle de l'acide kojique et plus de 60 fois plus importante que celle de l'acide ascorbique. On mesure ainsi l'intérêt de cette ε-viniférine en particulier dans les domaines cosmétique et thérapeutique.

Comme exposé ci-dessus, les différentes dispositions du procédé de l'invention permettent également d'obtenir du resvératrol (Rv) pratiquement débarrassé d'ε-viniférine, Rv-Sec.

L'invention vise donc plus particulièrement les applications de ces produits dans les domaines indiqués ci-dessus.

Elle vise spécialement les compositions cosmétiques contenant une quantité efficace d'ε-viniférine et/ou de Rv définis ci-dessus en association avec des excipients acceptables en cosmétologie.

Elle vise aussi bien des compositions renfermant des quantités efficaces d'ε-viniférine et/ou de Rv, utilisables pour leurs propriétés pharmacologiques, dans des pathologies liées directement à, ou qui ont comme corollaire, une production exagérée de mélanine (melasma, chloasma ou certains mélanomes, par exemple).

Les compositions pharmaceutiques de l'invention sont ainsi caractérisées en ce qu'elles renferment une quantité efficace d'ε-viniférine et/ou de Rv purifiés selon le procédé défini ci-dessus, en association avec des excipients acceptables pour une application topique ou pour un usage interne.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention sont donnés dans les exemples qui suivent.

Il y est fait référence aux figures 1 à 13 qui représentent respectivement :

- Figure 1 : un chromatogramme d'EBPS-Sol,
- Figure 2 : un chromatogramme de la fraction A3-Rv-Sec riche en resvératrol lyophilisée,
- Figure 3 : un chromatogramme de la fraction A3-Vf-Sec riche en viniférine lyophilisée,
- Figures 4-11, les histogrammes représentant les quantités en mg d'ε-viniférine et de resvératrol des fractions issues des exemples B1 à B8,
- Figures 12-13, les histogrammes représentant les quantités en mg d'ε-viniférine et de resvératrol des fractions issues des exemples C1 et C2.

A : on rapporte ci-après à titre d'exemple, un mode opératoire général d'obtention d'ε-viniférine à partir d'un extrait d'EBPS provenant des rafles et sarments de vigne faisant usage du polymère PVDF.

Procédé :

1ère phase : adsorption de l'ε-viniférine

- L'EBPS est tout d'abord dissous dans un solvant A. Celui-ci doit satisfaire les deux conditions :
    1. Le solvant A doit solubiliser la totalité des constituants de l'EBPS.
    2. Il ne doit pas être capable d'éluer l'ε-viniférine du PVDF.

Le solvant A est un mélange binaire ou ternaire de solvants miscibles (formant une seule phase), dans lesquels, l'eau est majoritaire, ou de l'acétate d'éthyle, seul. Des solvants organiques idoines comprennent l'acétonitrile, l'acétone, et/ou le méthanol. Leur proportion, au total, représente 0,2 à 30%, le reste étant de l'eau (99,8 à 70%). Dans le cas des EBPS de sarments de vigne, de préférence, le solvant A est constitué de 3% d'acétonitrile + 97% d'eau ou 5% acétone + 95% eau.

L'EBPS-Sol dans le solvant A est d'abord mis au contact du PVDF, à température ambiante. Elle est ensuite soumise à une filtration au travers du PVDF, qui est alors rincé par plusieurs volumes de solvant A seul. Cette étape de contact adsorption/filtration, peut avoir lieu de diverses manières, dès lors qu'elles permettent ce rinçage. On peut agiter de la résine PVDF en présence d'EBPS-Sol, suivie d'une filtration et du rinçage sur un entonnoir filtrant (fritté de verre) ou garnir tout système muni d'une membrane filtrante (fritté de verre, d'inox ou de polyéthylène) de résine. Il peut s'agir d'une colonne basse pression ou d'une cartouche (type « SPE »), l'élution et le rinçage étant accélérés par le vide ou la pression du solvant A.

Après concentration de la part organique de ces filtrats Rv-Ads et Rinc, la solution aqueuse résiduelle est lyophilisée pour fournir le resvératrol enrichi ou purifié, Rv-Sec.

Au cours de cette filtration, l'ε-viniférine reste sélectivement adsorbée sur le PVDF, tandis que le resvératrol enrichi est élué avec ses autres oligomères contenus dans l'EBPS-Sol.

2ème phase : obtention de l'ε-viniférine

L'ε-viniférine est alors désorbée par plusieurs volumes de solvant B. Pour être capable de désorber l'ε-viniférine du PVDF, le solvant B doit comporter une plus grande, et au plus, une égale, proportion de solvant organique (miscible à l'eau). Il s'agira par exemple d'un mélange acétonitrile-eau (95:5), acétone-eau (90 :10) ou de méthanol-eau (50:50).

La solution de désorption obtenue, Vf-Des est concentrée par évaporation sous pression réduite de sa part organique. La solution aqueuse résiduelle, est séchée par lyophilisation et abandonne l'ε-viniférine enrichie ou purifiée, Vf-Sec.

Exemple A1 : sur cartouche SPE

Préparation du support

Le PVDF (33g/100ml) est conditionné avec une solution acétonitrile-eau (15:85) sous agitation pendant 30 minutes. Le PVDF utilisé ici est commercialisé par Alfa Aesar.

Le support est ensuite introduit dans une cartouche SPE vide munie d'un fritté. Le solvant est éliminé, sans toutefois, sécher le PVDF.

Introduction d'EBPS-Sol et rinçage de la résine

Après introduction d'un volume V = 30 ml d'EBPS-Sol à 1mg/ml dans une solution acétonitrile-eau (5:95), on effectue un rinçage de la colonne avec 5 fois le volume V (150 ml) avec le mélange acétonitrile-eau (5:95).

Les fractions rassemblées Rv-Ads et Rinc ainsi obtenues sont ensuite concentrées par évaporation sous vide. Elle renferme le resvératrol et les oligomères autres que l'ε-viniférine, Rv-Sec.

Désorption de l'ε-viniférine

Après l'étape de rinçage, on procède à l'étape de récupération des polyphénols adsorbés sur la résine, spécifiquement l'ε-viniférine. Cette étape est effectuée en éluant l'ε-viniférine avec un mélange acétonitrile-eau (95:5). Cette désorption peut-être également effectuée par un mélange méthanol-eau (50-50) ou acétone-eau (90 :10). Le volume utilisé est 3 fois le volume V, soit ici 90 ml.

Concentration

Les fractions Vf-Des sont réunies et concentrées par évaporation de l'acétonitrile sous vide, puis la phase aqueuse est lyophilisée pour livrer l'ε-viniférine purifiée, Vf-Sec.

Exemple A2 : filtration sur fritté

Préparation du support

On conditionne le support PVDF (10g) dans 30 ml solvant CH_3CN-H_2O (15:85) sous agitation pendant 30 minutes. Le PVDF utilisé ici est commercialisé par Alfa Aesar.

Le support PVDF est filtré sur verre fritté n°4. Le support est ainsi prêt.

On réalise une solution d'1 mg/ml d'EBPS-Sol dans un mélange d'acétonitrile-eau (3:97).

Introduction d'EBPS-Sol et rinçage du support

30 ml d'EBPS-Sol sont mélangés avec le support PVDF (agitation mécanique : spatule, agitateur magnétique). Une fois que le mélange est bien homogène, le tout est filtré sur fritté n°4.

Le support est ensuite rincé, avec dans cet exemple 30 ml du solvant A = CH_3CN-H_2O (3:97). On réalise ce rinçage 5 fois pour bien éliminer les autres oligomères.

Les fractions Rv-Ads et Rinc ainsi obtenues sont rassemblées et concentrées par évaporation sous vide. La fraction obtenue renferme le resvératrol et les oligomères autres que l'ε-viniférine, Rv-Sec.

Désorption de l'ε-viniférine

Le support est ensuite agité avec dans cet exemple 30 ml du solvant B = CH_3CN-H_2O (95:5) avant d'être filtré. On réalise cette opération 3 fois. On récupère alors le dimère ε-viniférine Vf-Sec par évaporation du solvant B sous vide, ou après concentration partielle et lyophilisation de la solution aqueuse résultante.

Exemple A3 : filtration sur fritté

Préparation du support

Le PVDF (400g/1000ml) est conditionné avec une solution acétone-eau (4:96) sous agitation pendant 30 minutes. Le PVDF utilisé ici est commercialisé par Alfa Aesar.

Le support PVDF est filtré sur verre fritté n°4. Le support est ainsi prêt.

On réalise une solution d'1 mg/ml d'EBPS-Sol dans un mélange d'acétone-eau (1:99).

Introduction d'EBPS-Sol et rinçage du support

1000 ml d'EBPS-Sol sont mélangés avec le support PVDF (agitation mécanique : spatule, agitateur magnétique). Une fois que le mélange est bien homogène, le tout est filtré sur fritté n°4.

Le support est ensuite rincé, avec dans cet exemple 1000 ml du solvant A = acétone-H_2O (1:99). On réalise ce rinçage 10 fois pour bien éliminer les autres oligomères.

Les fractions Rv-Ads et Rinc ainsi obtenues sont rassemblées et concentrées par évaporation sous vide. Elle renferme le resvératrol et les oligomères autres que l'ε-viniférine, Rv-Sec

Désorption de l'ε-viniférine

Le support est ensuite agité avec dans cet exemple 1000 ml du solvant B = acétone-H_2O (90:10) avant d'être filtré. On réalise cette opération 2 fois. On récupère alors le dimère ε-viniférine Vf-Sec par évaporation du solvant B sous vide, ou après concentration partielle et lyophilisation de la solution aqueuse résultante.

Quantités obtenues après concentration et lyophilisation

Fraction	quantité
A3-Rv-Sec	550 mg
A3-Vf-Sec	450 mg
Quantité totale	**1000 mg**

Quantités de resvératrol et d'ε-viniférine obtenues dans chaque fraction

Fraction	quantité totale	resvératrol	ε-viniférine
EBPS-Sec	1000 mg	124 mg	158 mg
A3-Rv-Sec	550 mg	52 mg	14,6 mg
A3-Vf-Sec	450 mg	9,4 mg	81 mg

La fraction A3-Rv-Sec renferme alors plus de 42% de la masse totale de resvératrol alors que la fraction A3-Vf-Sec contient plus de 51% de la masse totale d'ε-viniférine.

Il en résulte un enrichissement supplémentaire en resvératrol dans la fraction A3-Rv-Sec avec un facteur de 4,5 ; et en ε-viniférine dans la fraction A3-Vf-Sec avec un facteur 6,8.

B : purification d'une phase aqueuse riche en polyphénols de type stilbénoïde : EBPS-Sol en utilisant de l'acétate d'éthyle comme solvant extractif.

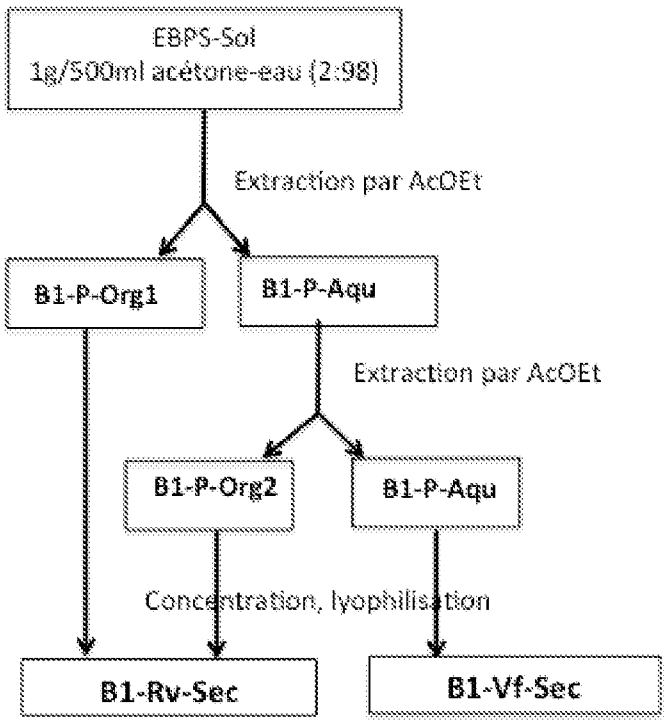
La solution aqueuse d'un extrait brut végétal de polyphénols de type stilbénoïde EBPS-Sol est extraite par l'acétate d'éthyle. Il en résulte un enrichissement supplémentaire en resvératrol dans la phase acétate d'éthyle avec un facteur 4, et en ε-viniférine dans la phase aqueuse, avec un facteur 3.

Exemple B1 : séparation liquide-liquide

1g d'extrait d'EBPS est dissous dans 500 ml d'une solution d'acétone-eau (2:98). On effectue ensuite une extraction liquide-liquide par l'acétate d'éthyle (AcOEt

ci-après) (2 fois 500 ml). Les deux phases obtenues sont concentrées par évaporation sous vide et lyophilisées. La fraction organique obtenue B1-Rv-Sec renferme alors plus de 56% de la masse totale de resvératrol alors que la fraction aqueuse obtenue B1-Vf-Sec contient plus de 79% de la masse totale d'ε-viniférine.

Schéma d'enrichissement :



Quantités obtenues après concentration et lyophilisation

Fraction	Quantité
B1-Rv-Sec	229 mg
B1-Vf-Sec	556,7 mg
Quantité totale	**785,7 mg**

Quantités de resvératrol et d'ε-viniférine obtenues dans chaque fraction

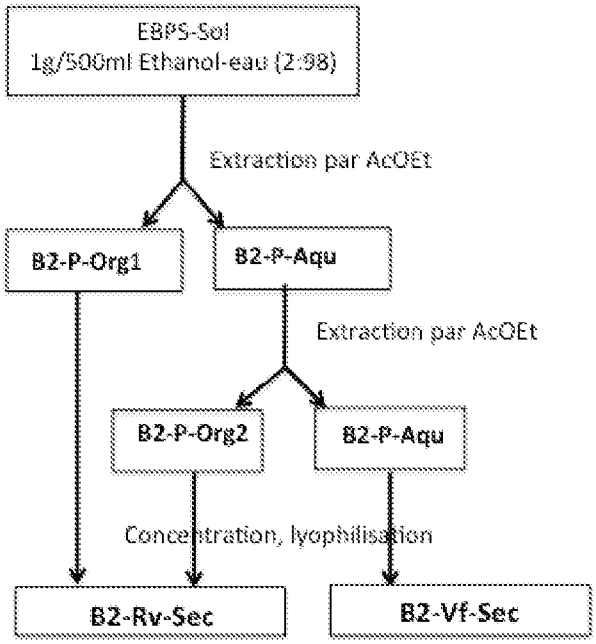
Fraction	quantité totale	resvératrol	ε-viniférine
EBPS-Sec	1000 mg	169 mg	216 mg
B1-Rv-Sec	229 mg	81,5 mg	22,4 mg
B1-Vf-Sec	556,7 mg	80,7 mg	185,9 mg

Il en résulte un enrichissement supplémentaire en resvératrol dans la fraction B1-Rv-Sec avec un facteur de 4,6 ; et en ε-viniférine dans la fraction B1-Vf-Sec avec un facteur 1,8.

Exemple B2 : séparation liquide-liquide

1g d'extrait d'EBPS est dissous dans 500 ml d'une solution d'éthanol-eau (2:98). On effectue ensuite une séparation liquide-liquide par l'acétate d'éthyle (2 fois 500 ml). Les deux phases obtenues sont concentrées par évaporation sous vide et lyophilisées. La fraction organique obtenue B2-Rv-Sec renferme alors plus de 55% de la masse totale de resvératrol alors que la phase aqueuse obtenue B2-Vf-Sec contient plus 70% de la masse totale d'ε-viniférine.

Schéma d'enrichissement :



Quantités obtenues après concentration et lyophilisation

Fraction	quantité
B2-Rv-Sec	223 mg
B2-Vf-Sec	535,4 mg
Quantité totale	**758,4 mg**

Quantités récupérées en resvératrol et en ε-viniférine dans chaque fraction

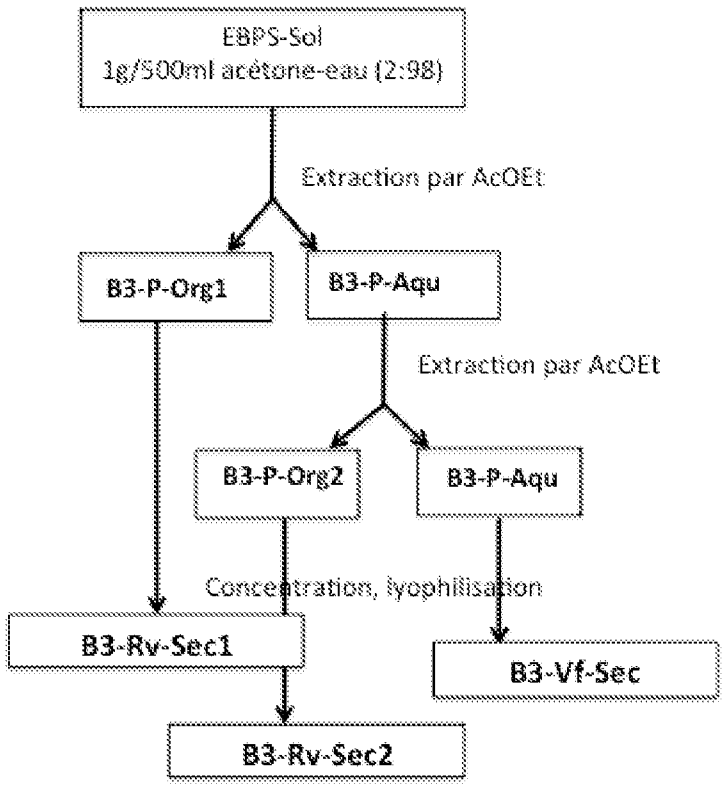
Fraction	quantité totale	resvératrol	ε-viniférine
EBPS-Sec	1000 mg	169 mg	216 mg
B2-Rv-Sec	306 mg	85,2 mg	23,6 mg
B2-Vf-Sec	700 mg	51,4 mg	144,6 mg

Il en résulte un enrichissement supplémentaire en resvératrol dans la fraction B2-Rv-Sec avec un facteur de 4,6 ; et en ε-viniférine dans la fraction B2-Vf-Sec avec un facteur 2,2.

Exemple B3 : séparation liquide-liquide

1g d'extrait d'EBPS est dissous dans 500 ml d'une solution d'acétone-eau (2:98). On effectue ensuite une séparation liquide-liquide par l'acétate d'éthyle (2 fois 500 ml). Les deux phases organiques sont évaporées sous vide séparément et lyophilisées. La phase aqueuse obtenue est concentrée par évaporation sous vide et lyophilisée. La première fraction organique B3-Rv-Sec1 renferme alors plus de 43% de la masse totale de resvératrol alors que la phase aqueuse B3-Vf-Sec contient plus 67% de la masse totale d'ε-viniférine. La deuxième fraction organique B3-Rv-Sec2 ne renferme seulement que 4,6% de la masse totale d'EBPS déposé.

Schéma d'enrichissement :



Quantités obtenues après concentration et lyophilisation

Fraction	quantité
B3-Rv-Sec1	256,4 mg
B3-Rv-Sec2	46,6 mg
B3-Vf-Sec	519,9 mg
Quantité totale	**822,9 mg**

Quantités récupérées en resvératrol et en ε-viniférine dans chaque fraction

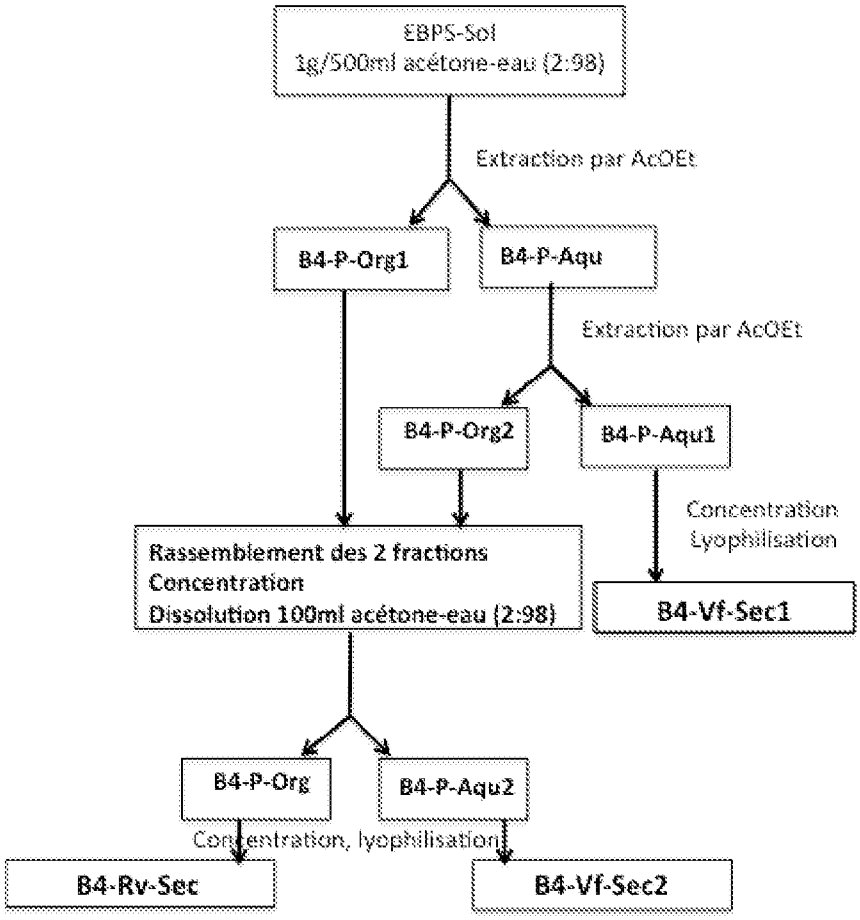
Fraction	quantité totale	resvératrol	ε-viniférine
EBPS-Sec	1000 mg	265 mg	237 mg
B3-Rv-Sec1	256,4 mg	115,1 mg	28,7 mg
B3-Rv-Sec2	46,6 mg	10,1 mg	3,7 mg
B3-Vf-Sec	519,9 mg	55,6 mg	160,6 mg

Il en résulte un enrichissement supplémentaire en resvératrol dans la fraction B3-Rv-Sec1 avec un facteur de 4 et dans la fraction B3-Rv-Sec2 avec un facteur de 2,7 ; et en ε-viniférine dans la fraction B3-Vf-Sec avec un facteur 3,2.

Exemple B4 : séparation liquide-liquide

1g d'extrait d'EBPS est dissous dans 500 ml d'une solution d'acétone-eau (2:98). On effectue ensuite une séparation liquide-liquide par l'acétate d'éthyle (2 fois 500 ml). Les deux phases organiques, rassemblées sont évaporées sous vide et re-dissous dans 100ml d'une solution d'acétone-eau (2 :98). La solution est ensuite extraite par l'acétate d'éthyle. La fraction organique ainsi que les 2 phases aqueuses sont évaporées sous vide et lyophilisées. La fraction organique obtenue B4-Rv-Sec renferme plus de 50% de la masse totale de resvératrol alors que la phase aqueuse 1 obtenue, B4-Vf-Sec1 contient plus 57% de la masse totale d'ε-viniférine. La phase aqueuse 2 obtenue, B4-Vf-Sec2 ne renferme moins de 1,6% de la masse totale d'EBPS déposé.

Schéma d'enrichissement :



Quantités obtenues après concentration et lyophilisation

Fraction	quantité
B4-Rv-Sec	274,7 mg
B4-Vf-Sec1	540 mg
B4-Vf-Sec2	15,7 mg
Quantité totale	**830,4 mg**

Quantités récupérées en resvératrol et en ε-viniférine dans chaque fraction

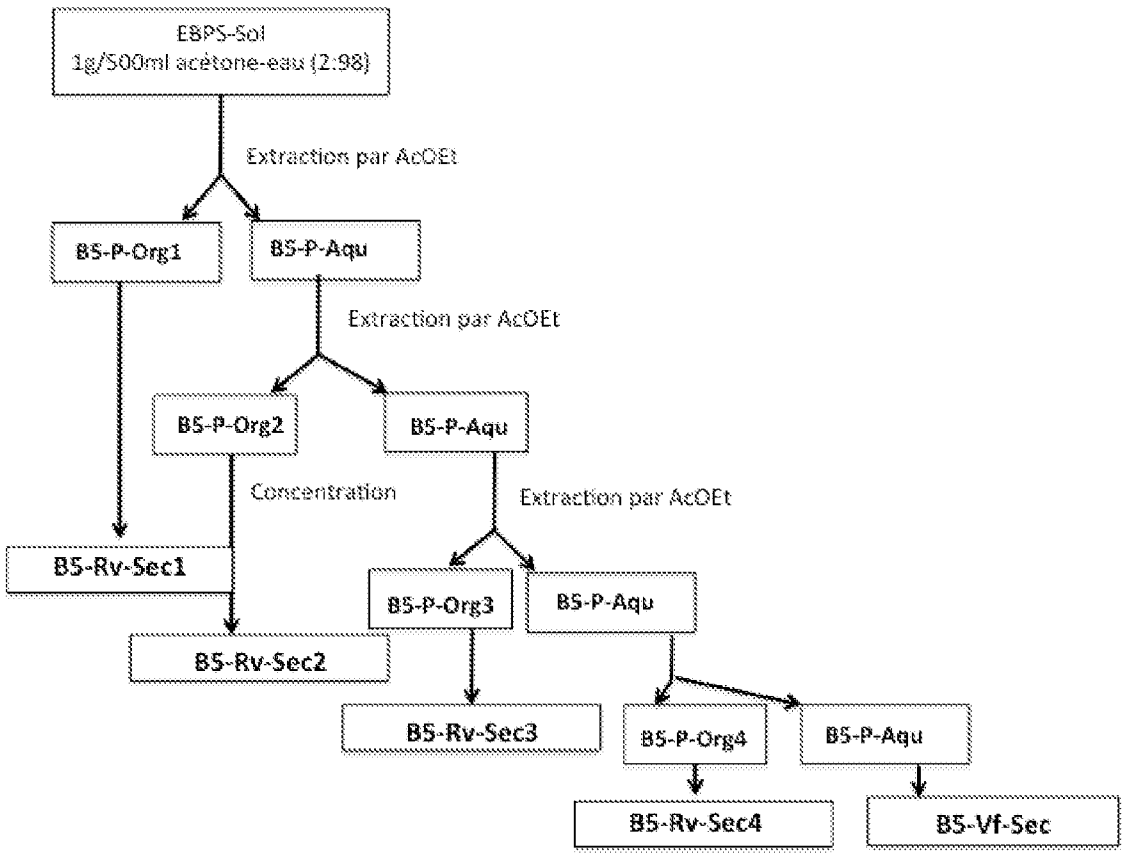
Fraction	quantité totale	resvératrol	ε-viniférine
EBPS-Sec	1000 mg	265 mg	237 mg
B4-Rv-Sec	274,7 mg	136,2 mg	32,9 mg
B4-Vf-Sec1	540 mg	49,1 mg	136,6 mg
B4-Vf-Sec2	15,7 mg	1,1 mg	5,3 mg

Il en résulte un enrichissement supplémentaire en resvératrol dans la fraction B4-Rv-Sec avec un facteur de 3,7 ; et en ε-viniférine dans la fraction B4-Vf-Sec1 avec un facteur de 3,1 et dans la fraction B4-Vf-Sec2 avec un facteur de 5,4.

Exemple B5 : séparation liquide-liquide

1g d'extrait d'EBPS est dissous dans 500 ml d'une solution d'acétone-eau (2:98). On effectue ensuite une séparation liquide-liquide par l'acétate d'éthyle (4 fois 500 ml). Chacune des phases organiques ainsi que la phase aqueuse sont évaporées sous vide et lyophilisées. La première fraction organique obtenue, B5-Rv-Sec1 renferme plus de 45% de la masse totale de resvératrol alors que les trois autres phases organiques ne contiennent seulement au total 11% de la masse totale de resvératrol. La phase aqueuse B5-Vf-Sec contient plus 65% de la masse totale d'ε-viniférine.

Schéma d'enrichissement :



Quantités obtenues après concentration et après lyophilisation

Fraction	quantité
B5-Rv-Sec1	271,9 mg
B5-Rv-Sec2	53,6 mg
B5-Rv-Sec3	13,7 mg
B5-Rv-Sec4	25,5 mg
B5-Vf-Sec	505,3 mg
Quantité totale	**870 mg**

Quantités récupérées en resvératrol et en ε-viniférine dans chaque fraction

Fraction	quantité totale	resvératrol	ε-viniférine
EBPS-Sec	1000 mg	265 mg	237 mg
B5-Rv-Sec1	271,9 mg	121,2 mg	31,5 mg
B5-Rv-Sec2	53,6 mg	19,9 mg	7,1 mg
B5-Rv-Sec3	13,7 mg	3,6 mg	2,6 mg
B5-Rv-Sec4	25,5 mg	7,7 mg	5,5 mg
B5-Vf-Sec	505,3 mg	42,4 mg	153,6 mg

Il en résulte un enrichissement supplémentaire en resvératrol dans la fraction B5-Rv-Sec1 avec un facteur de 3,4 ; et en ε-viniférine dans la fraction B5-Vf-Sec avec un facteur de 4,1.

Exemple B6 : séparation liquide-liquide à partir de sarments

Préparation de l'extrait brut de sarments

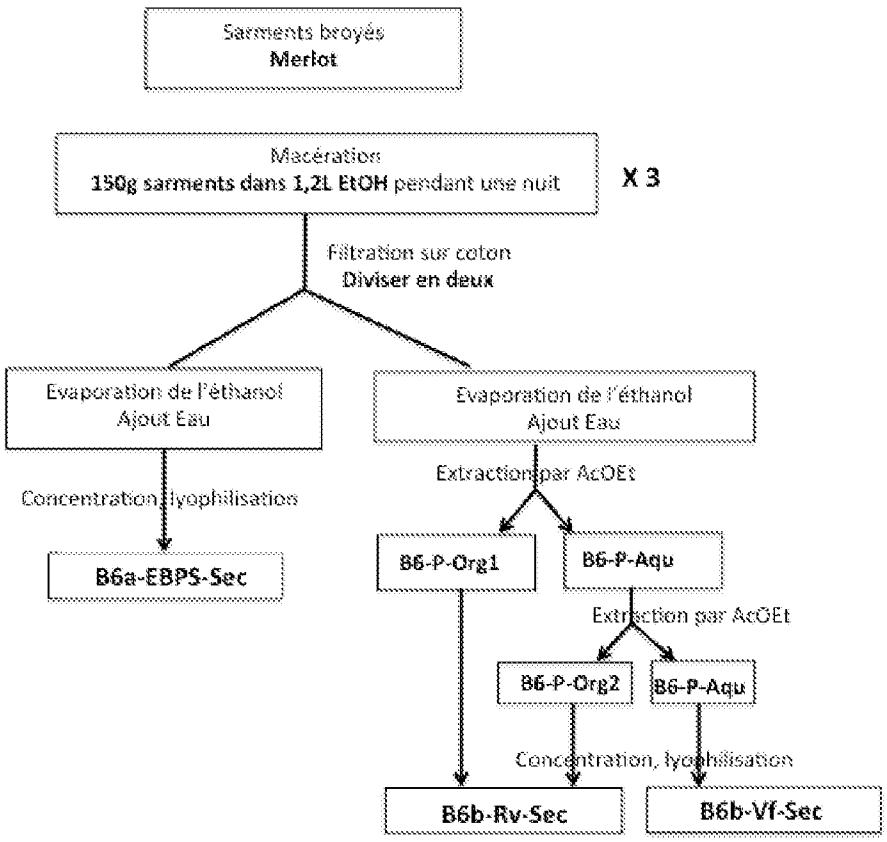
150g de sarments broyés de *Vitis vinifera*, cépage Merlot, récoltés dans le sud de la France (Gard, Languedoc Roussillon) en décembre 2011 sur des parcelles exploitées en agriculture biologique, sont macérés dans 1,2 litres d'éthanol (EtOH ci-après) distillé et agités à l'abri de la lumière pendant 1 nuit. Après filtration, cette opération est réalisée 2 autres fois. Les 3 fractions sont rassemblées et le milieu est divisé en deux. La première partie est concentrée sous vide et lyophilisée, obtenant la fraction B6a-EBPS-Sec.

Partition de la phase aqueuse par l'acétate d'éthyle

Sur la deuxième partie, après évaporation sous vide de l'éthanol puis ajout d'eau, on effectue une séparation liquide-liquide par l'acétate d'éthyle (2 fois 250 ml). Les deux phases organiques, rassemblées sont évaporées sous vide, obtenant la fraction B6b-Rv-Sec, la phase eau est lyophilisée. La fraction organique B6b-Rv-Sec renferme

plus de 60% de la masse totale de resvératrol alors que la fraction aqueuse B6b-Vf-Sec contient plus 42% de la masse totale d'ε-viniférine.

Schéma d'enrichissement :



Quantités obtenues après concentration et lyophilisation

Fraction	quantité
B6a-EBPS-Sec	5,79 g
B6b-Rv-Sec	0,8426 g
B6b-Vf-Sec	3,8769 g
Quantité totale	**10,509 g**

Quantités récupérées en resvératrol et en ε-viniférine dans chaque fraction

Fraction	quantité totale	resvératrol	ε-viniférine
B6a-EBPS-Sec	5,79 g	264 mg	146,5 mg
B6b-Rv-Sec	0,8426 g	158,6 mg	47,3 mg
B6b-Vf-Sec	3,8769 g	44,5 mg	62,4 mg

Il en résulte un enrichissement supplémentaire en resvératrol dans la fraction B6b-Rv-Sec avec un facteur de 1,9 ; et en ε-viniférine dans la fraction B6b-Vf-Sec avec un facteur de 2,5.

Exemple B7 : séparation liquide-liquide à partir de sarments

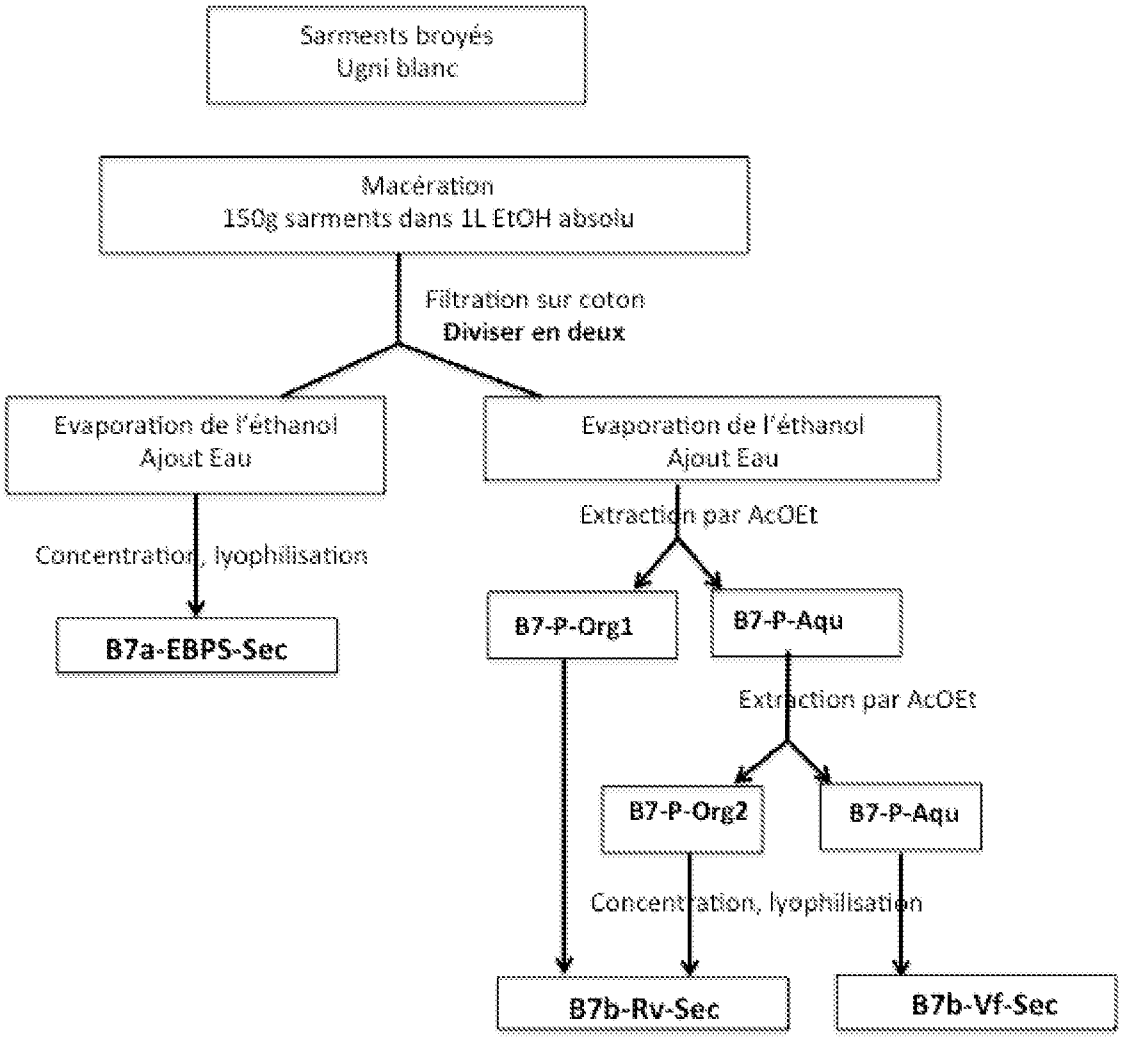
Préparation de l'extrait brut de sarments

150g de sarments broyés de *Vitis vinifera*, cépage Ugni Blanc, récoltés dans le sud de la France (Gard, Languedoc Roussillon) en décembre 2011 sur des parcelles exploitées en agriculture biologique, sont macérés dans 1 litre d'éthanol absolu et agités, à l'abri de la lumière pendant 72 heures. Après filtration sur coton, le milieu est divisé en deux. La première partie est concentrée sous vide et lyophilisée, obtenant la fraction B7a-EBPS-Sec.

Partition de la phase aqueuse par l'acétate d'éthyle

Sur la deuxième partie, après évaporation sous vide de l'éthanol puis ajout d'eau, on effectue une séparation liquide-liquide par l'acétate d'éthyle (2 fois 250 ml). Les deux phases organiques, rassemblées sont évaporées sous vide, obtenant la fraction B7b-Rv-Sec, la phase eau est lyophilisée. La fraction organique B7b-Rv-Sec renferme plus de 68% de la masse totale de resvératrol alors que la fraction aqueuse B7b-Vf-Sec contient plus 58% de la masse totale d'ε-viniférine.

Schéma d'enrichissement :



Quantités obtenues après concentration et lyophilisation

Fraction	quantité
B7a-EBPS-Sec	1,21 g
B7b-Rv-Sec	227 mg
B7b-Vf-Sec	647 mg
Quantité totale	**2,084 g**

Quantités récupérées en resvératrol et en ε-viniférine dans chaque fraction

Fraction	quantité totale	resvératrol	ε-viniférine
B7a-EBPS-Sec	1,21 g	24,3 mg	55,2 mg
B7b-Rv-Sec	227 mg	16,7 mg	16,9 mg
B7b-Vf-Sec	647 mg	7,7 mg	32,0 mg

Il en résulte un enrichissement supplémentaire en resvératrol dans la fraction B7b-Rv-Sec avec un facteur de 2,2 ; et en ε-viniférine dans la fraction B7b-Vf-Sec avec un facteur de 1,8.

Exemple B8 : séparation liquide-liquide à partir de sarments

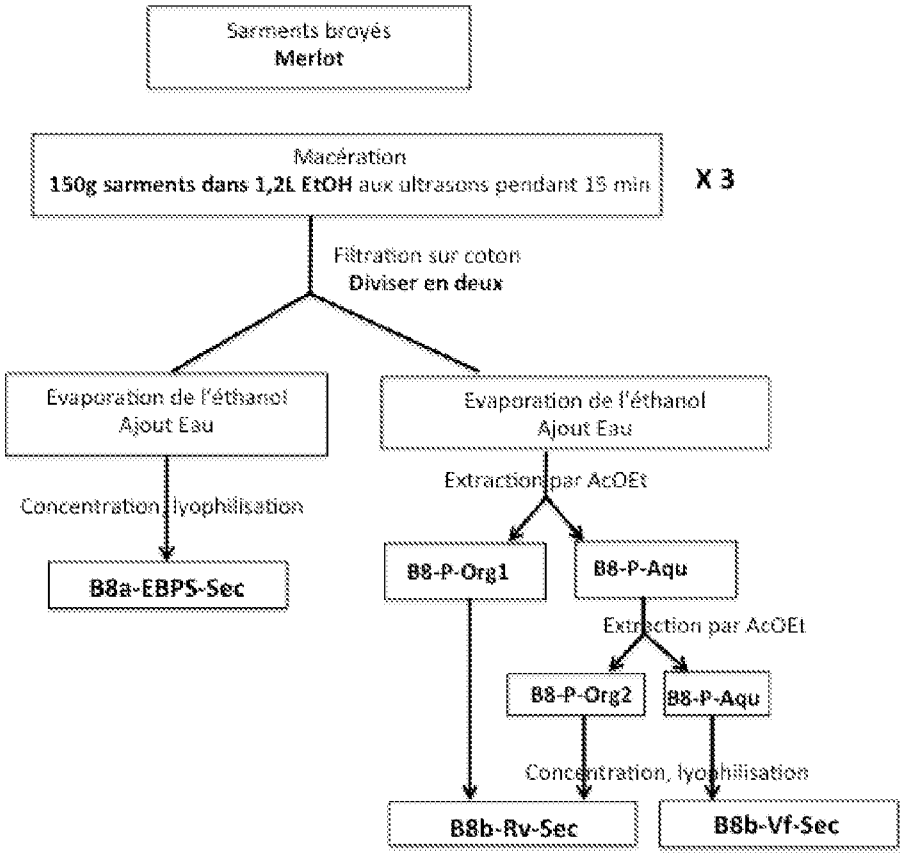
Préparation de l'extrait brut de sarments

150g de sarments broyés de *Vitis vinifera*, cépage Merlot, récoltés dans le sud de la France (Gard, Languedoc Roussillon) en décembre 2011 sur des parcelles exploitées en agriculture biologique, sont macérés dans 1,2 litres d'éthanol distillé et agités, sous ultra-sons, à l'abri de la lumière pendant 15 minutes. Après filtration, cette opération est réalisée 2 autres fois. Les 3 fractions sont rassemblées et le milieu est divisé en deux. La première partie est concentrée sous vide et lyophilisée, obtenant la fraction B8a-EBPS-Sec.

Partition de la phase aqueuse par l'acétate d'éthyle

Sur la deuxième partie, après évaporation sous vide de l'éthanol puis ajout d'eau, on effectue une séparation liquide-liquide par l'acétate d'éthyle (2 fois 250 ml). Les deux phases organiques, rassemblées sont évaporées sous vide, obtenant la fraction B8b-Rv-Sec, la phase eau est lyophilisée. La fraction organique B8b-Rv-Sec renferme plus de 70% de la masse totale de resvératrol alors que la fraction aqueuse B8b-Vf-Sec contient plus 56% de la masse totale d'ε-viniférine.

Schéma d'enrichissement :



Quantités obtenues après concentration et lyophilisation

Fraction	quantité
B8a-EBPS-Sec	3,12 g
B8b-Rv-Sec	0,527 g
B8b-Vf-Sec	2,074 g
Quantité totale	**5,721 g**

Quantités récupérées en resvératrol et en ε-viniférine dans chaque fraction

Fraction	quantité totale	resvératrol	ε-viniférine
B8a-EBPS-Sec	3,12 g	90,5 mg	48 mg
B8b-Rv-Sec	0,527 g	63,9 mg	16,4 mg
B8b-Vf-Sec	2,074 g	17,4 mg	26,7 mg

Il en résulte un enrichissement supplémentaire en resvératrol dans la fraction B8b-Rv-Sec avec un facteur de 2,1 ; et en ε-viniférine dans la fraction B8b-Vf-Sec avec un facteur de 2,9.

C : purification d'une phase aqueuse riche en polyphénols de type stilbénoïde : solution issue de la mise en œuvre du procédé faisant usage du polymère PVDF, en utilisant de l'acétate d'éthyle comme solvant extractif.

Dans l'exemple C1, la phase aqueuse issue d'une extraction liquide liquide par l'acétate d'éthyle (P-Aqu) est traitée par la mise en œuvre du procédé faisant usage du polymère PVDF. Il en résulte un enrichissement supplémentaire en ε-viniférine dans la phase aqueuse, avec un facteur 10.

Dans l'exemple C2, la phase aqueuse issue de la mise en œuvre du procédé faisant usage du polymère PVDF (Vf-Des) subit ensuite une extraction liquide liquide par l'acétate d'éthyle. Il en résulte un enrichissement supplémentaire en ε-viniférine dans la phase aqueuse, avec un facteur 14.

Exemple C1 : séparation liquide-liquide suivie d'une purification par PVDF sur fritté

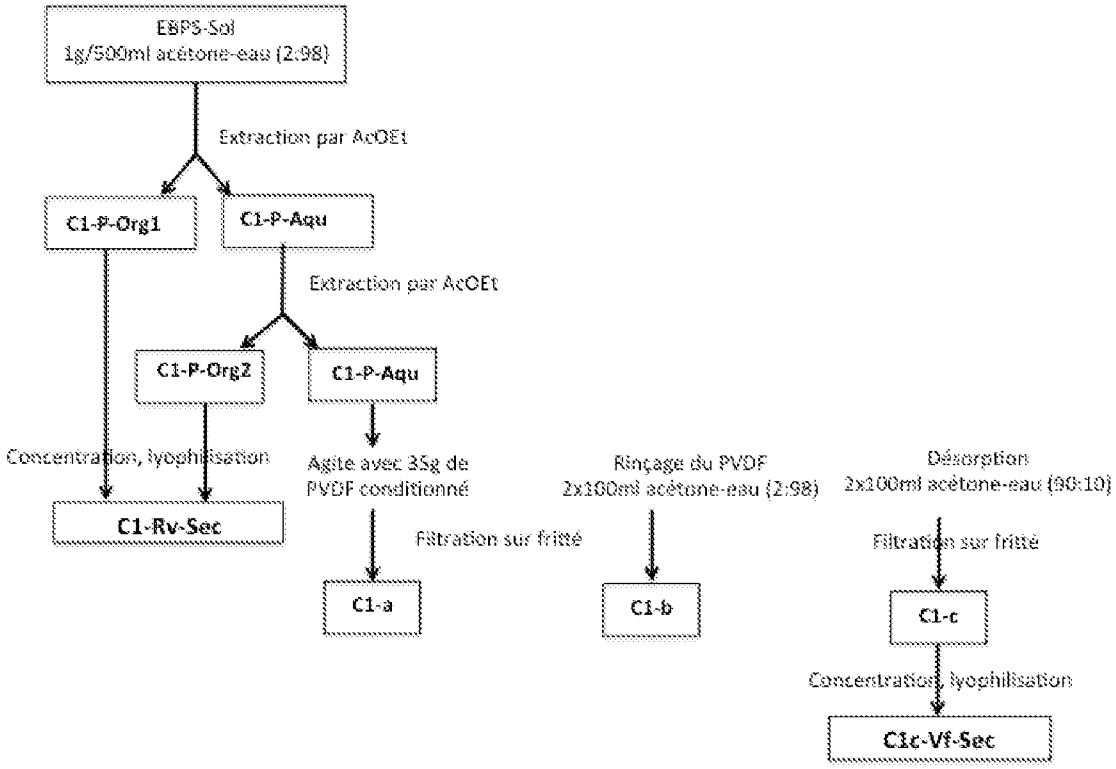
Préparation du support

On conditionne le support PVDF (35g) dans 100 ml d'acétone-H_2O (2:98) sous agitation pendant 30 minutes. Le PVDF utilisé ici est commercialisé par Alfa Aesar.
Le support PVDF est filtré sur verre fritté n°4. Le support est ainsi prêt.

Préparation de la solution d'EBPS-Sol

1g d'extrait d'EBPS est dissous dans 500 ml d'une solution d'acétone-eau (2:98).

Schéma d'enrichissement :



Partition de la phase aqueuse par l'acétate d'éthyle

L'EBPS-Sol est extraite 2 fois par un volume équivalent d'acétate d'éthyle. La phase acétate d'éthyle est concentrée sous vide et lyophilisée ou évaporée à siccité (C1-Rv-Sec), alors que la phase aqueuse (C1-P-Aqu) est traitée sur le support PVDF comme suit.

Adsorption de la phase aqueuse sur la résine

La phase aqueuse (180ml) est mélangée avec le support PVDF (agitation mécanique). Une fois que le mélange est bien homogène, le tout est filtré sur fritté n°4. Le support est ensuite rincé avec 2 fois 100 ml acétone-eau (2:98).

Désorption de l'ε-viniférine

Le support est ensuite agité avec 100 ml d'acétone-eau (90:10) avant d'être filtré. On réalise une autre fois cette opération. On récupère alors une fraction riche en dimère ε-viniférine par évaporation du solvant sous vide, ou après concentration partielle et lyophilisation de la solution aqueuse résultante, notée C1c-Vf-Sec.

Dans la phase organique (C1-Rv-Sec), plus de 57% de la masse totale de resvératrol sont récupérés, alors que dans la fraction C1c-Vf-Sec, on isole plus de 47% de la masse totale de l'ε-viniférine.

Quantités obtenues après concentration et lyophilisation

Fraction	quantité
C1-Rv-Sec	368,6 mg
C1-a	116,4 mg
C1-b	42,3 mg
C1c-Vf-Sec	236,3 mg
Quantité totale	**763,6 mg**

Quantités de resvératrol et d'ε-viniférine obtenues dans chaque fraction

Fraction	quantité totale	resvératrol	ε-viniférine
EBPS-Sec	1000 mg	202,9 mg	206 mg
C1-Rv-Sec	368,6 mg	117,2 mg	34,3 mg
C1-a	116,4 mg	16,1 mg	11,2 mg
C1-b	42,3 mg	9,1 mg	8,9 mg
C1c-Vf-Sec	236,3 mg	9,9 mg	97,5 mg

Il en résulte un enrichissement supplémentaire en resvératrol dans la fraction C1-Rv-Sec avec un facteur de 3,5 ; et en ε-viniférine dans la fraction C1c-Vf-Sec avec un facteur de 9,7.

Exemple C2 : purification par PVDF sur fritté d'un extrait EBPS, suivi d'une séparation liquide-liquide de la phase aqueuse

Préparation du support

On conditionne le support PVDF (50g) dans 500 ml d'acétone-H_2O (2:98) sous agitation pendant 30 minutes. Le PVDF utilisé ici est commercialisé par Alfa Aesar.
Le support PVDF est filtré sur verre fritté n°4. Le support est ainsi prêt.

Introduction d'EBPS-Sol et rinçage de la résine

Après introduction d'un volume V = 500 ml d'une solution d'EBPS-Sol à 2 mg/ml dans une solution acétone-eau (2:98), le milieu est mélangé avec le support PVDF (agitation mécanique). Une fois que le mélange est bien homogène, le tout est filtré sur fritté n°4 (fraction C2a-Rv-Ads). Le support est ensuite rincé avec 5 fois 100

ml acétone-eau (2:98) (fraction C2b-Rinc). Les fractions C2a-Rv-Ads et C2b-Rinc ainsi obtenues sont concentrées par évaporation sous vide. Elles renferment le resvératrol et les oligomères autres que l'ε-viniférine, Rv-Sec.

Désorption de l'ε-viniférine

Le support est ensuite agité avec 100 ml d'acétone-eau (90:10) avant d'être filtré. On réalise une autre fois cette opération. On récupère alors la fraction aqueuse riche en dimère ε-viniférine.

La fraction aqueuse est divisé en deux. La première partie est concentrée et lyophilisée (C2c-Vf-Sec). La deuxième partie subit une extraction liquide-liquide par l'acétate d'éthyle.

Partition de la phase aqueuse par l'acétate d'éthyle

Sur la deuxième partie de la phase aqueuse, après évaporation sous vide de l'acétone, on effectue une séparation liquide-liquide par l'acétate d'éthyle (2 fois 100 ml). Les deux phases sont évaporées sous vide et lyophilisées, obtenant la fraction C2d, et la fraction C2d-Vf-Sec.

Quantités obtenues après concentration et lyophilisation

Fraction	quantité
C2a-Rv-Sec	235,7 mg
C2b-Rv-Sec	120,8 mg
C2c-Vf-Sec	148,9 mg
C2d	44,4 mg
C2d-Vf-Sec	103,3 mg
Quantité totale	**653,1 mg**

Quantités de resvératrol et d'ε-viniférine obtenues dans chaque fraction

Fraction	quantité totale	resvératrol	ε-viniférine
EBPS-Sec	1000 mg	173,3 mg	143,4 mg
C2a-Rv-Sec	235,7 mg	40,8 mg	18,6 mg
C2b-Rv-Sec	120,8 mg	38,9 mg	10,1 mg
C2c-Vf-Sec	148,9 mg	6,5 mg	26,6 mg
C2d	44,4 mg	4,3 mg	6,5 mg
C2d-Vf-Sec	103,3 mg	1,4 mg	19,7 mg

Il en résulte un enrichissement supplémentaire en resvératrol dans les fractions C2a-Rv-Sec et C2b-Rv-Sec avec un facteur, respectivement de 1,8 ; 3,2; et en ε-

viniférine dans la fraction C2c-Vf-Sec avec un facteur de 5 et dans la fraction C2d-Vf-Sec de 17,2.

Application :

L'ε-viniférine ainsi purifiée, dans le test de l'activité inhibitrice de la tyrosinase, s'est révélée être beaucoup plus active qu'elle ne l'avait été dans les conditions du brevet EP 1 519 709 de la Demanderesse portant sur des applications cosmétiques de polyphénols et de leurs dérivés.

L'ε-viniférine purifiée s'avère 4 fois plus active que l'acide kojique et 62 fois plus active que la vitamine C.

	CI_{50} µM
ε-viniférine purifiée	4,1 ± 0,5
Acide kojique	16,9 ± 1,1
Resvératrol purifié	52,8 ± 1,4
Acide ascorbique	255 ± 10

Les conditions expérimentales utilisées sont identiques à celles décrites précédemment dans le brevet EP mentionné plus haut.

Revendications

1/ Procédé d'obtention d'ε-viniférine purifiée (Vf-Sec) et/ou de resvératrol appauvri voire exempt en ε-viniférine (Rv-Sec), à partir d'un extrait, brut (EBPS), sec (EBPS-sec), ou en solution (EBPS-Sol) d'une matière végétale riche en polyphénols de type stilbénoïde, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un cycle d'adsorption-désorption sur support solide de type poly(fluorure de vinylidène) ou PVDF avec EBPS-Sol, et/ou une partition de cette solution EBPS-Sol avec l'acétate d'éthyle.

2/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la solution EPBS-Sol utilisée dans l'étape d'adsorption sur ledit support solide est obtenue par dissolution de l'extrait sec (EBPS-Sec) dans un solvant capable de solubiliser la totalité des constituants et ne permettant pas la désorption de l'ε-viniférine du PVDF.

3/ Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le solvant est constitué uniquement par de l'acétate d'éthyle seul ou par un mélange dans lequel l'eau est majoritaire qui comprend un ou plusieurs solvants organiques, miscibles à l'eau, formant une seule phase.

4/ Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que des solvants appropriés comprennent l'acétonitrile, l'acétone, et/ou le méthanol.

5/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, caractérisé en ce que lesdits solvants représentent au total 0,2 à 30%, le reste étant de l'eau.

6/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la solution (EBBS-Sol) obtenue est soumise à une étape d'adsorption de l'ε-viniférine par filtration au travers du PVDF, lequel est rincé par plusieurs volumes du même solvant, les fractions de rinçage avec le filtrat constituant la solution enrichie en resvératrol (Rv-Ads et Rv-Rinc).

7/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'étape de désorption de l'ε-viniférine est réalisée à l'aide d'un solvant comportant, par rapport à l'eau, une plus grande proportion de solvant organique miscible à l'eau.

8/ Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le solvant utilisé pour la désorption est un mélange acétonitrile-eau (95:5), acétone-eau (90 :10), ou de méthanol-eau (50:50) et dans le cas où l'acétate d'éthyle est utilisé comme seul solvant dans la phase d'adsorption, par un solvant polaire sans eau.

9/ Procédé selon la revendication 7 ou 8, caractérisé en ce que les différents filtrats (Vf-Des) sont réunis et concentrés par évaporation de la part organique, ces étapes étant suivies d'une lyophilisation de la phase aqueuse, et dans le cas où l'acétate d'éthyle est utilisé comme seul solvant dans la phase d'adsorption, par évaporation à siccité, ce qui conduit, dans ces deux cas, à un extrait sec enrichi en ε-viniférine (Vf-Sec).

10/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que par partition avec l'acétate d'éthyle, volume à volume de la solution aqueuse de l'extrait sec ou de l'extrait brut de polyphénols de type stilbénoïde, l'ε-viniférine est obtenue purifiée dans la phase aqueuse (P-Aqu) et le resvératrol dans la phase organique (P-Org).

11/ En tant que nouveaux produits, l'ε-viniférine Vf et/ou le resvératrol Rv tels qu'obtenus par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, l'ε-viniférine présentant une pureté supérieure à 77%, en masse et pouvant atteindre pratiquement 100%, avec une activité inhibitrice de la tyrosine plus de 4 fois supérieure à celle de l'acide kojique et plus de 60 fois supérieure à celle de l'acide ascorbique, et resvératrol pratiquement pur à 100%.

12/ Application de l'ε-viniférine et /ou du resvératrol selon la revendication 11 en cosmétique ou en thérapeutique.

Figure 1

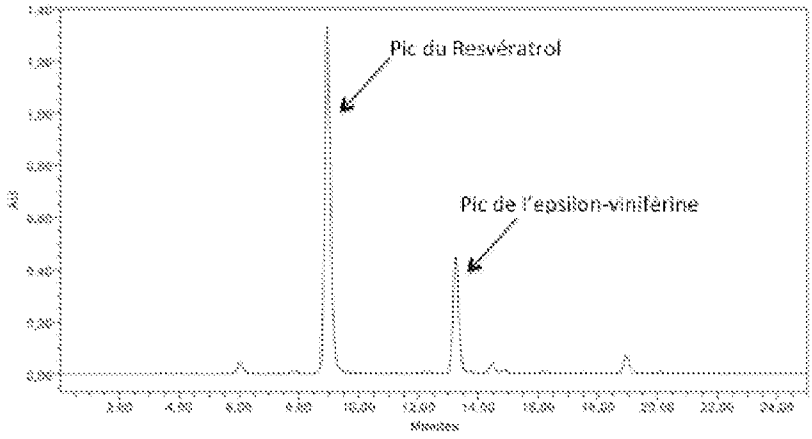


Figure 2

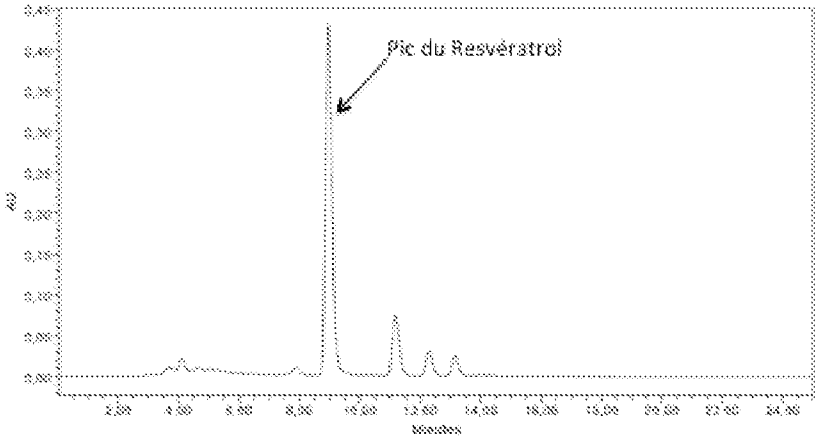


Figure 3

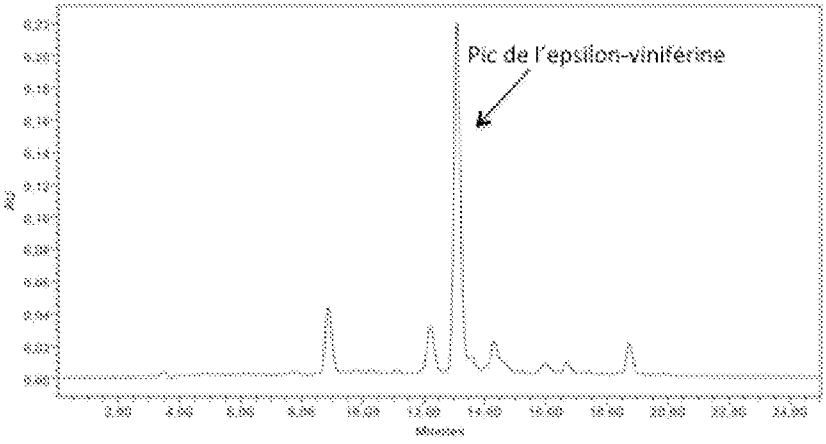


Figure 4

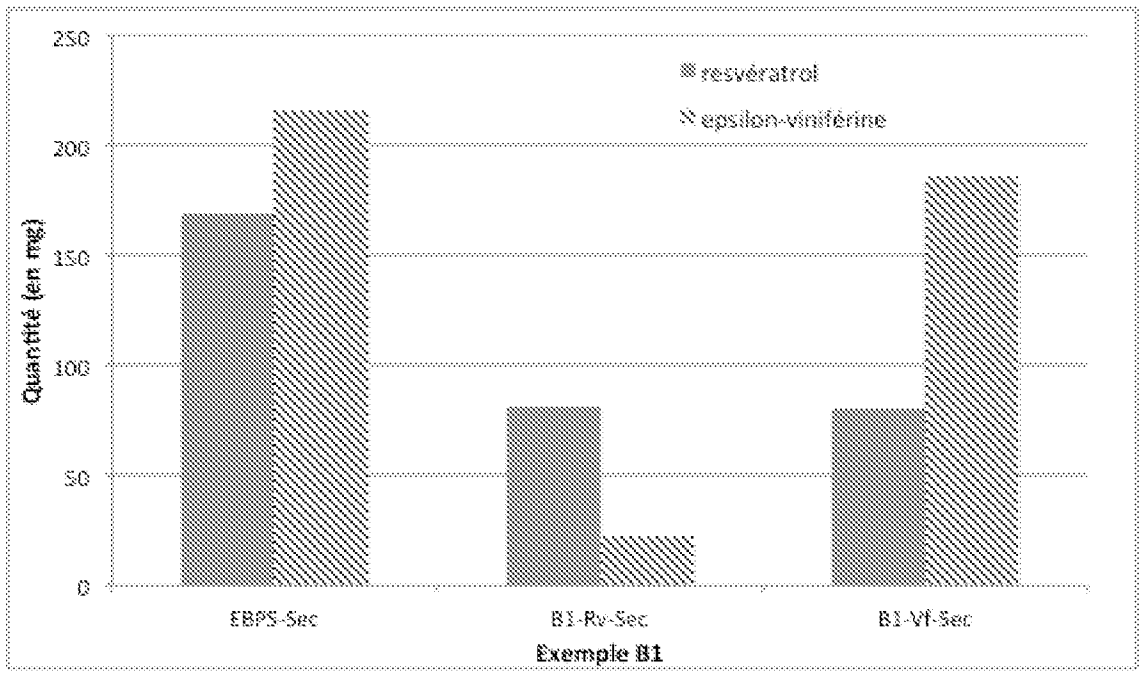


Figure 5

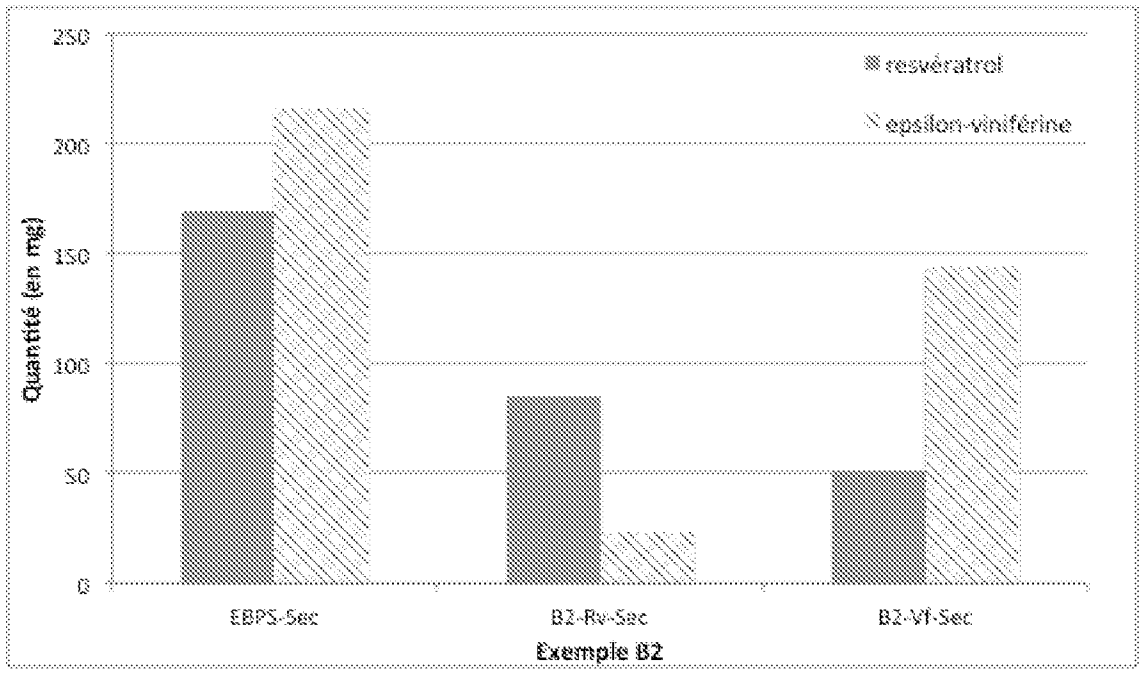


Figure 6

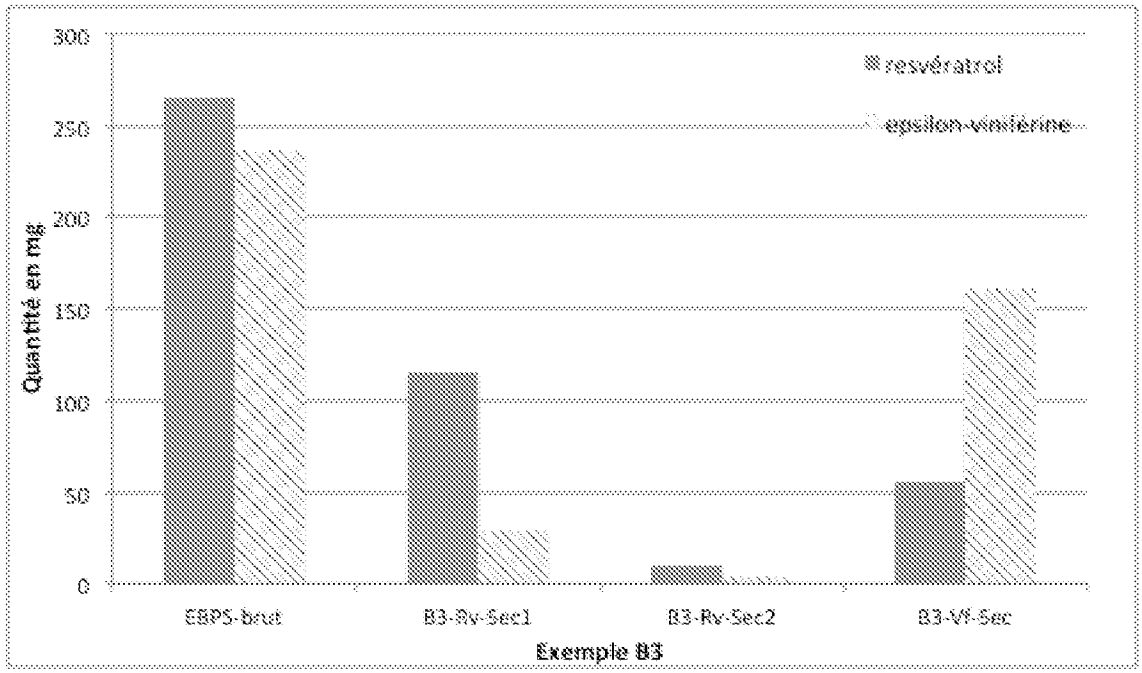


Figure 7

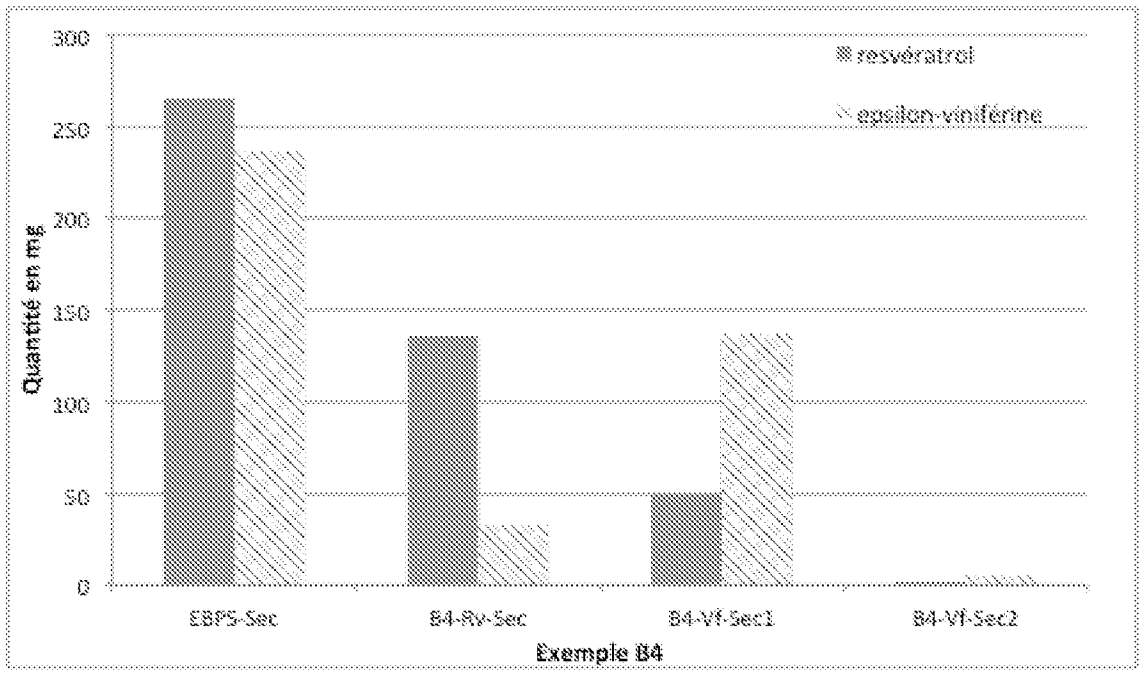


Figure 8

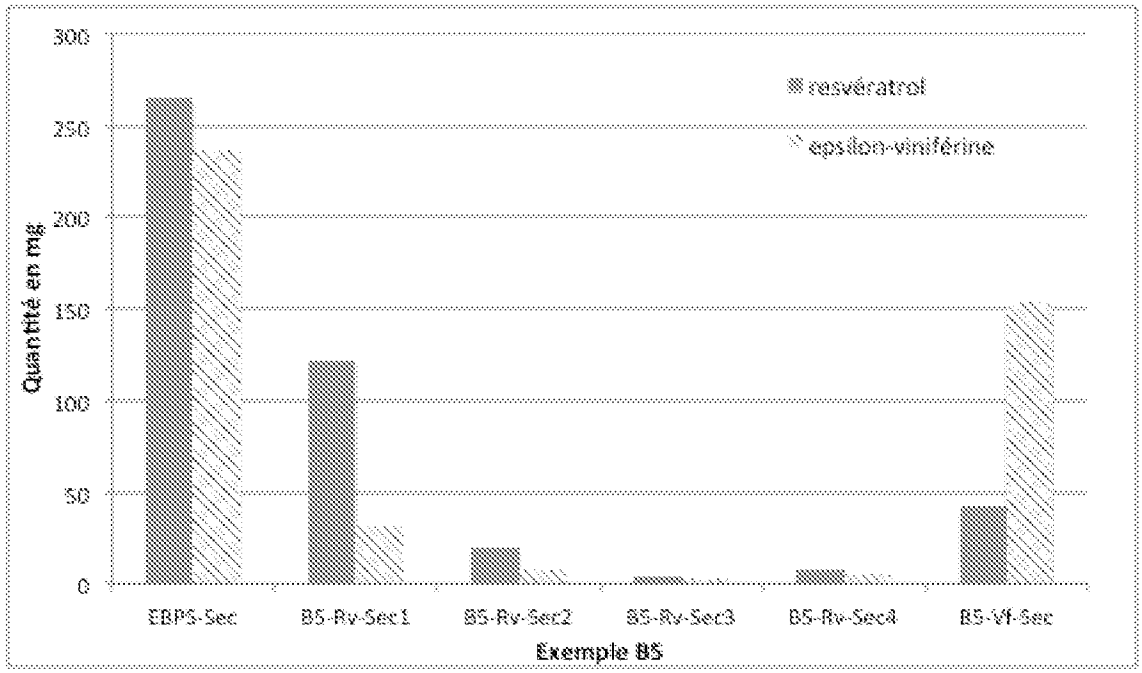


Figure 9

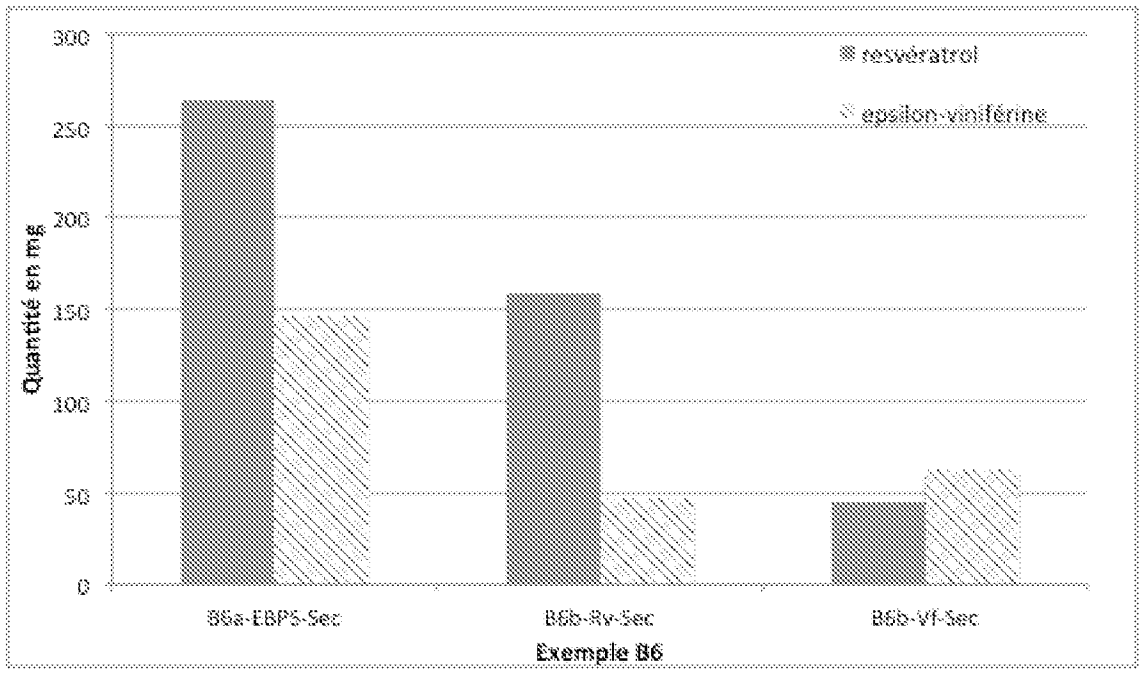


Figure 10

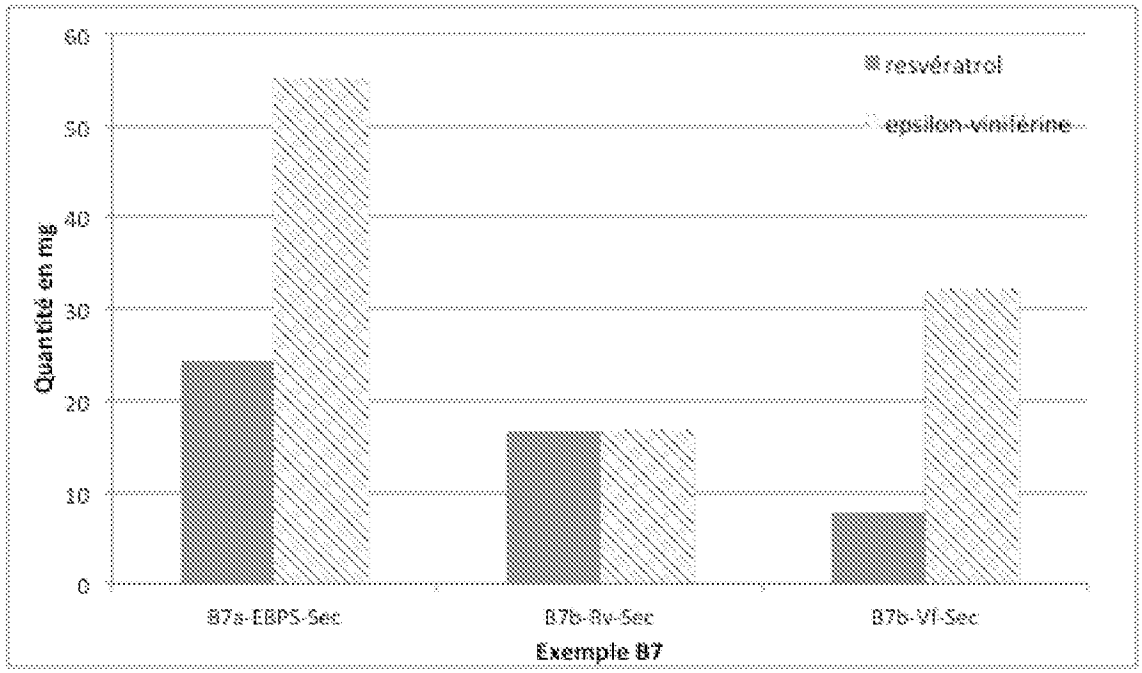


Figure 11

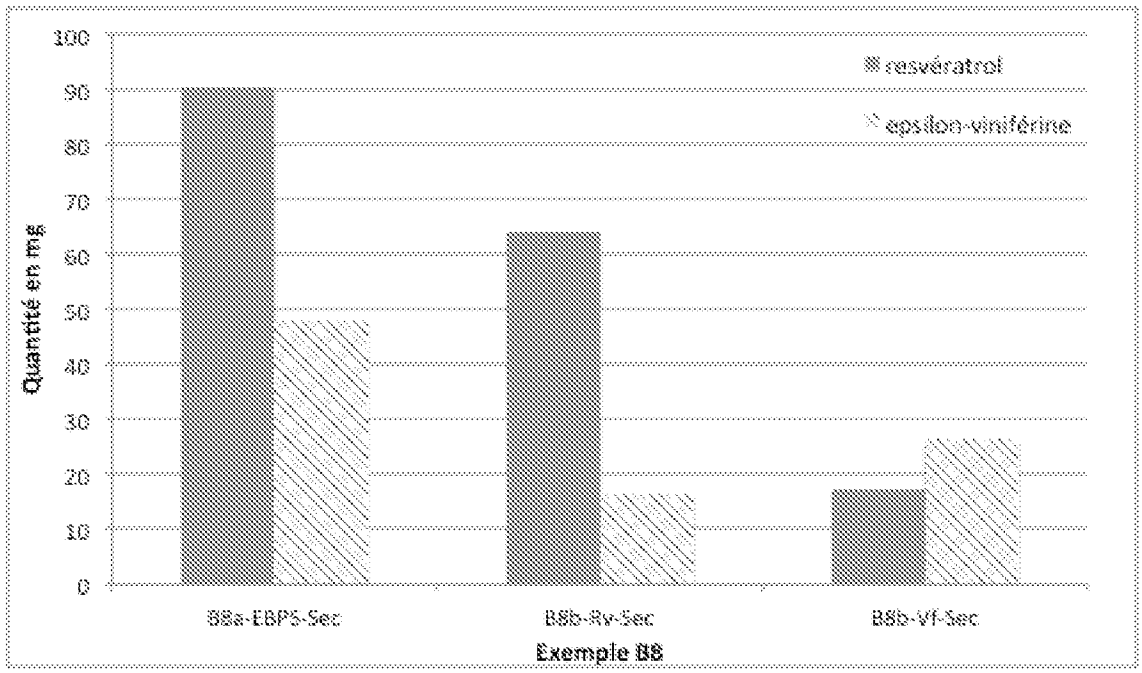


Figure 12

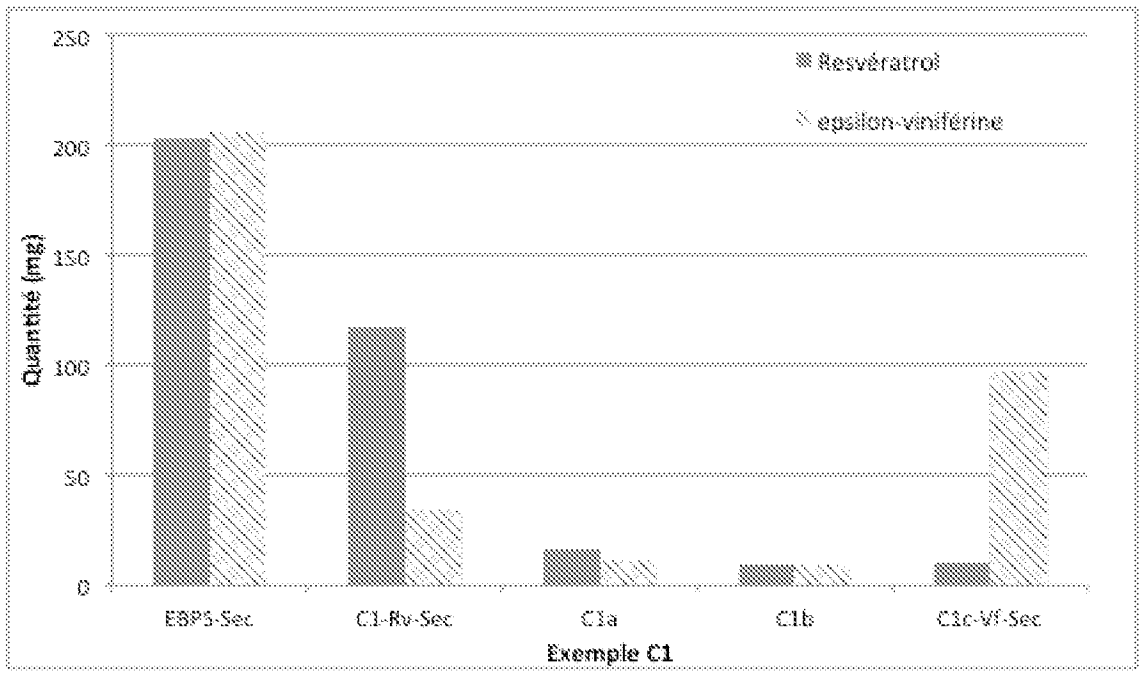


Figure 13a

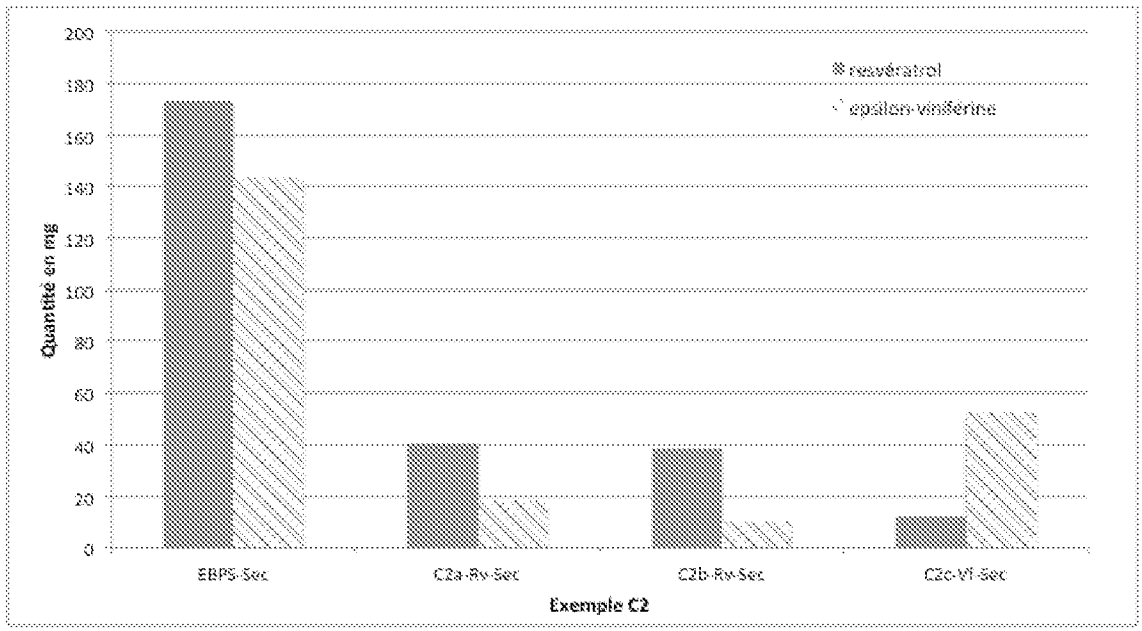
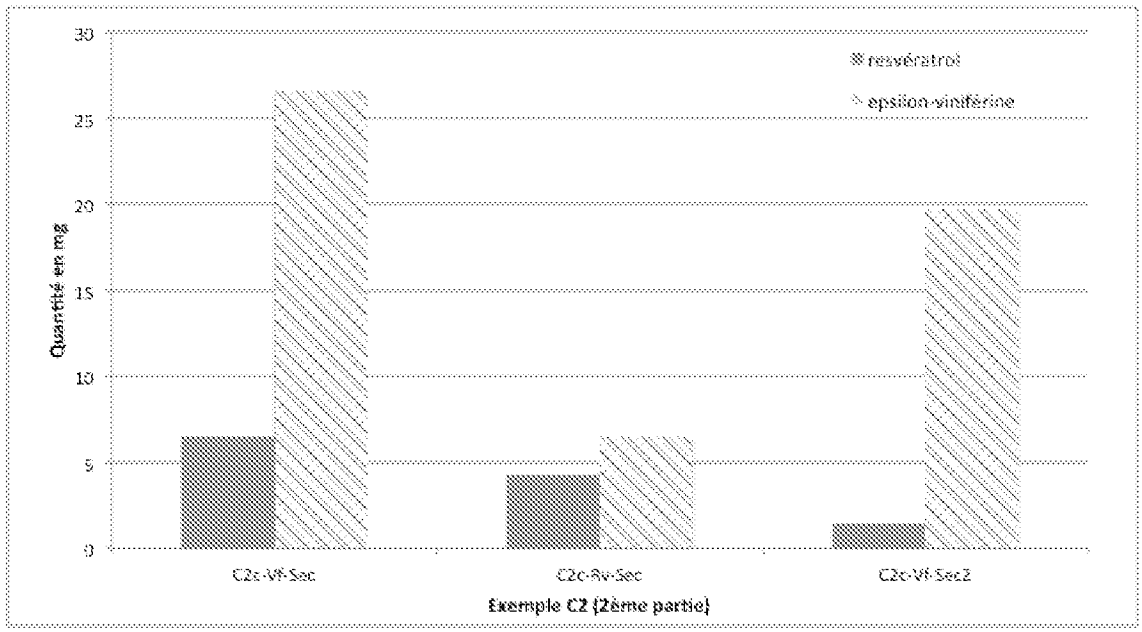


Figure 13b


30
25
20
15
10
5
0
Quantité en mg
resvératrol
epsilon-viniférine
C2c-Vf-Sec
C2c-Rv-Sec
C2c-Vf-Sec2
Exemple C2 (2ème partie)