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

(21) BR 112019012712-7 A2

(22) Data do Depósito: 21/12/2017

(43) Data da Publicação Nacional: 26/11/2019

(54) Título: PREPARAÇÃO DE UM EXTRATO DE BIOMASSA SECA RICO EM POLIFENÓIS

(51) Int. Cl.: A01N 37/10; A01N 65/00; A01P 3/00.

(30) Prioridade Unionista: 22/12/2016 FR 1663205.

(71) Depositante(es): ANTOFENOL.

(72) Inventor(es): FANNY ROLET; LUDOVIC FABRE.

(86) Pedido PCT: PCT EP2017084116 de 21/12/2017

(87) Publicação PCT: WO 2018/115296 de 28/06/2018

(85) Data da Fase Nacional: 19/06/2019

(57) Resumo: A presente invenção se refere a um processo para preparar um extrato rico em polifenóis de biomassa vegetal seca, em particular partes de videiras, o extrato obtido e seu uso para aplicações antifúngicas, em particular para a prevenção e tratamento de infecções fúngicas em frutas e plantas após a colheita, mas também para aplicações relacionadas às suas propriedades antibacterianas e antioxidantes.

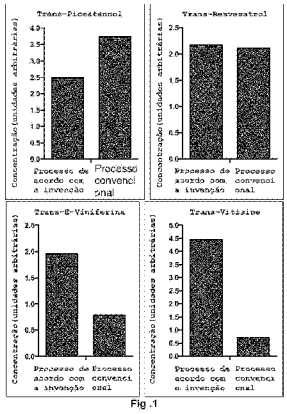

Fig .1

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para: **"PREPARAÇÃO DE UM EXTRATO DE BIOMASSA SECA RICO EM POLIFENÓIS"**

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se refere a um processo para preparar um extrato rico em polifenóis de biomassa vegetal seca, em particular partes de videiras, o extrato obtido e seu uso para aplicações antifúngicas, em particular para a prevenção e tratamento de infecções fúngicas em frutas e vegetais após a colheita, mas também para aplicações relacionadas às suas propriedades antibacterianas e antioxidantes.

ESTADO DA TÉCNICA

[002] Extratos ricos em polifenol de biomassa vegetal são conhecidos do especialista. Muito trabalho se concentrou na extração de biomassa para obter um extrato rico em polifenóis, todos com várias desvantagens em termos de viabilidade econômica dos processos, como baixos rendimentos ou longos períodos de extração, ou limitando seu uso após a extração, e particularmente o uso de solventes orgânicos tóxicos (Goupil *et al*. 2012, Alexa *et al*. 2012, Sanchez *et al*. 2008, Pezet *et al*. 2004).

[003] Várias técnicas e usos de extração de polifenol são descritas em particular nas patentes e pedidos de patente US 2012/0021080, US 5.989.557, US 2012/0142105,

JP 2016 102192, CN 205 759 861, CN 103 875 842, ou em artigos de Osorio *et al*. (2010), Luque-Rodriguez *et al*. (2006) ou Favaron e Lucchetta (2009).

[004] Estudos mostraram que é possível melhorar os processos de extração de biomassa por micro-ondas, tratamentos ultrassônicos ou de alta temperatura (Quan *et al*. 2006, CN 104 177 463, CN 104 435 135, CN 102 757 512, CN 104 256 432, CN 104 256 641, CN 103 783 506, CN 102 757 509, CN 101 816 349), por exemplo, para a preparação de biodiesel (CN 19 35 947). Alguns recomendam tratamento a alta temperatura sob alta pressão (Casazza *et al*. 2010).

[005] No entanto, tais tratamentos de alta temperatura podem alterar as propriedades dos extratos obtidos e não serão adequados para a implementação de um processo industrial em grandes volumes de matérias-primas e solventes.

[006] Existe a necessidade de um processo eficiente de extração de biomassa para preparar um extrato rico em polifenol, que seja eficiente e mais econômico e não afete as propriedades da biomassa em relação aos seus polifenóis.

DIVULGAÇÃO DA INVENÇÃO

[007] A presente invenção se refere a um processo para preparar um extrato de biomassa vegetal seca, em particular um extrato rico em polifenol de Vitis sp. compreendendo (a) uma etapa de extração da biomassa seca

colocando-a em contato com um solvente aquoso e (b) uma etapa de recuperação da fase aquosa enriquecida com polifenol, caracterizada pelo fato de que na etapa de extração (a) a mistura de biomassa vegetal/solvente aquoso é tratada simultaneamente ou sequencialmente pela combinação de

i) ondas eletromagnéticas com frequências que variam entre 915 MHz e 28 GHz, e

ii) agitação da mistura e/ou

(iii) pressão de 50 a 950 mbar (5.000 a 95.000 Pa).

[008] A invenção também diz respeito ao extrato obtido por este processo e seu uso para aplicações antifúngicas, em particular para a prevenção e tratamento de infecções fúngicas em frutas e plantas após a colheita.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[009] A invenção se refere à preparação de um extrato rico em polifenol por extração de uma biomassa seca com um solvente aquoso.

[0010] De acordo com a invenção, o termo "solvente aquoso" significa água ou uma mistura de álcool alifático/água, em particular etanol/água. Neste caso, a mistura álcool/água, em particular etanol/água, contém 10 a 70% em volume de etanol. De acordo com uma modalidade preferida da invenção, o solvente aquoso é uma mistura etanol/água contendo 15 a 40% de etanol.

[0011] A biomassa vegetal de acordo com a invenção é

a biomassa que é conhecida por conter polifenóis, em particular trans-resveratrol, trans-ε-viniferina, trans-piceatannol e trans-vitisin. O especialista está familiarizado com esta biomassa a partir de plantas conhecidas por conterem estes polifenóis, utilizadas sozinhas ou em misturas, geralmente, plantas dicotiledôneas tais como videiras, chá e poligonácea japonesa, mais particularmente videiras. Para a biomassa de acordo com a invenção, serão utilizadas plantas inteiras ou partes de plantas, mais particularmente as partes aéreas de plantas, tais como frutos, flores, folhas, caules, ramos ou fragmentos de tronco (videiras), e misturas das mesmas. Se necessário, a biomassa também pode compreender ou consistir de raízes de plantas.

[0012] A biomassa é seca, isto é, obtida por secagem das plantas ou partes de plantas acima mencionadas. A secagem pode ser realizada por qualquer método conhecido pelo especialista. Vantajosamente, a secagem é conseguida deixando as plantas ou as suas partes secas ao ar livre. De acordo com uma modalidade preferida da invenção, as plantas ou as suas partes separadas são colocadas para secar ao ar livre durante 1 mês a 4 anos, de preferência de 1 a 2 anos.

[0013] De um modo preferido, a biomassa seca consiste em partes secas de plantas do gênero *Vitis*, particularmente *Vitis vinifera*, *Vitis labrusca*, *Vitis riparia*, *Vitis*

berlandieri, *Vitis amurensis*, *Vitis coignetiae*, *Vitis vulpina*, *Vitis acerifolia*, *Vitis aestivalis*, *Vitis rotundifolia*, e mais particularmente, *Vitis vinifera*. De acordo com uma modalidade vantajosa da invenção, a biomassa seca compreende ou consiste em sarmentos (*vine shoots*).

[0014] Vantajosamente, esta biomassa seca é constituída por fragmentos de plantas, particularmente plantas de solo ou partes de plantas. Preferencialmente, os fragmentos têm um tamanho de partícula de menos de 1 cm, de preferencialmente menor ou igual a 5 mm, preferencialmente variando de 1 a 5 mm. Este tamanho de partícula dos fragmentos de matéria seca/matéria seca do solo é medido de acordo com os métodos comuns bem conhecidos pelas pessoas versadas na técnica.

[0015] A fragmentação das plantas secas será realizada de acordo com os métodos comuns conhecidos pelo especialista. De acordo com uma modalidade particular da invenção, estes fragmentos são obtidos primeiro por trituração da matéria seca para obter fragmentos de 1 a 20 cm, que são depois moídos para obter os fragmentos, de preferência, de 1 a 5 mm, que correspondem a um tamanho de partícula preferido para extração.

[0016] O especialista será capaz de determinar as quantidades de solvente de extração a serem usadas em relação à quantidade de biomassa. Vantajosamente, a proporção em

massa da biomassa vegetal seca para o solvente aquoso varia de 1/5 a 1/30, de um modo preferido de 1/10 a 1/20.

[0017] O processo de acordo com a invenção é caracterizado pela combinação de pelo menos duas tensões aplicadas simultaneamente ou sucessivamente na mistura de extração (biomassa/solvente):

i) ondas eletromagnéticas com frequências que variam entre 915 MHz e 28 GHz, e

ii) agitação e/ou

iii) pressão de 50 a 950 mbar.

[0018] De acordo com a invenção, a expressão "agitação simultânea ou sequencial" significa que o tratamento por micro-ondas e pelo menos a agitação e/ou a pressão menor ou igual a 950 mbar são realizados ao mesmo tempo, ou um após o outro, em particular, de acordo com as sequências (i) + (ii), ou (i) + (iii), ou (i) + (ii) + (iii), ou [(i), (ii)] + (iii), ou [(ii), (iii)] + (i), em qualquer ordem. No caso de tratamento sequencial, o especialista pode optar por repetir cada sequência várias vezes ou combinar diferentes sequências de acordo com um programa pré-determinado, opcionalmente combinado com uma ou mais sequências de tratamento simultâneas.

[0019] De acordo com uma modalidade preferida da invenção, os três tratamentos são realizados simultaneamente [(i), (ii), (iii)].

[0020] A etapa (a) também pode compreender um tratamento ultrassônico (iv). Este tratamento pode ser aplicado sequencialmente ou simultaneamente com os tratamentos (i), (ii) e/ou (iii) acima definidos.

[0021] Ondas eletromagnéticas com frequências variando de 915 MHz a 28 GHz correspondem a ondas no domínio de micro-ondas. O especialista será capaz de escolher a frequência mais adequada para a implementação do processo, em particular de acordo com a biomassa, a fim de otimizar o processo de extração. A frequência das ondas eletromagnéticas varia de 915 MHz a 2,45 GHz. Vantajosamente, a frequência das ondas eletromagnéticas será escolhida de acordo com dispositivos industriais conhecidos para gerar ondas eletromagnéticas à escala industrial, em particular geradores de frequências abaixo de 1500 MHz, mais vantajosamente de cerca de 915 MHz.

[0022] O especialista também será capaz de escolher a potência de onda mais adequada à biomassa e aos extratos obtidos. A potência das ondas eletromagnéticas varia de 300 W a 100 kW, mais vantajosamente de 1 a 75 kW.

[0023] Esta potência será escolhida em particular de acordo com o volume a ser tratado e o tempo necessário para a extração. De acordo com uma modalidade preferida da invenção, a potência das ondas eletromagnéticas é escolhida de acordo com a seguinte razão: para 1 kg de material a

extrair, a potência das ondas eletromagnéticas é de 1 a 10 kW, idealmente 2 a 6 kW.

[0024] Vantajosamente, o tempo de extração será de pelo menos 20 minutos, ou mesmo de pelo menos 30 minutos e de preferência menos de 125 minutos, entendendo-se que um tempo muito curto pode estar associado a condições de excesso de potência que podem alterar a biomassa enquanto um tempo muito longo pode levar à degradação dos produtos extraídos e, portanto, em ambos os casos, um risco de perda de polifenol.

[0025] O processo de acordo com a invenção é adequado para uso em diferentes volumes de mistura de biomassa/solvente, em particular em pelo menos 1 L, de um modo preferido pelo menos 5 L. O processo de acordo com a invenção é particularmente adequado para a extração industrial de biomassa seca. Vantajosamente, o processo será utilizado em volumes de mistura de biomassa/solvente de pelo menos 30 L, que podem variar até mais de 50 L ou até mais de 100 L. Dependendo dos reatores de extração disponíveis para o especialista, o processo de acordo com a invenção pode ser usado em volumes de mais de 200 L.

[0026] A mistura de biomassa/solvente é submetida à agitação (ii), sendo a referida agitação (ii), de um modo preferido, realizada ao mesmo tempo em que o tratamento com ondas eletromagnéticas (i). Essa agitação é importante para

permitir que as ondas eletromagnéticas atinjam toda a mistura, caso contrário, somente a superfície da mistura seria submetida à ação dessas ondas.

[0027] O especialista conhece o meio adequado para realizar uma operação de agitação de acordo com os volumes de mistura a ser tratada. Em particular, são conhecidos meios de rotação da mistura a ser tratada, geralmente por meio de lâminas rotativas no interior da mistura, ou por meio de rotação do reator contendo a mistura a ser tratada. O especialista pode considerar outros meios de agitação, tais como colocar a mistura em movimento por ar borbulhante ou gás inerte. De um modo preferido, a agitação é realizada rodando a mistura a uma velocidade de rotação que pode variar de 3 a 20 rotações por minuto, de um modo mais preferido por meio de lâminas rotativas dentro da mistura.

[0028] O especialista será capaz de escolher o meio de rotação mais adequado para implementação em um ambiente submetido a tratamento de ondas eletromagnéticas, susceptível de gerar arcos elétricos.

[0029] O processo também compreende submeter a mistura ao vácuo (iii), de um modo preferido durante o tratamento com ondas eletromagnéticas (i) e agitação (ii).

[0030] O especialista está familiarizado com os meios necessários para obter um vácuo (ou vácuo parcial) em um invólucro contendo uma mistura a ser tratada. Estes meios

industriais tornam possível obter uma pressão que varia de 50 a 950 mbar (5.000 a 95.000 Pa). Ele ou ela será capaz de escolher uma pressão apropriada de acordo com os volumes a serem tratados. Em particular, para volumes industriais como descrito acima, será vantajoso tratar a mistura a uma pressão de 50 a 950 mbar (5.000 a 95.000 Pa), de um modo preferido 50 a 500 mbar (5.000 a 50.000 Pa).

[0031] Como o processo também inclui o tratamento ultrassônico, a pessoa poderá escolher a frequência e a potência do ultrassom. Vantajosamente, a frequência de ultrassom varia de 25 kHz a 1 MHz. De acordo com uma modalidade preferida da invenção, a potência ultrassônica varia entre 200 e 4000 W.

[0032] A invenção também diz respeito a um processo como definido acima e nos exemplos, que compreende uma etapa adicional (c) de concentração dos polifenóis por evaporação parcial ou total do solvente aquoso.

[0033] De acordo com uma modalidade preferida da invenção, esta concentração (c) é realizada por liofilização da fase aquosa recuperada.

[0034] De acordo com uma modalidade particular da invenção, a biomassa seca é submetida, antes da etapa de extração (a), a lixiviação com um solvente apropriado para remover açúcares. O especialista será capaz de determinar as condições desta lixiviação de acordo com a biomassa seca e

seu teor de açúcar.

[0035] A remoção de açúcares, dependendo da biomassa tratada, será importante para a obtenção de um extrato rico em polifenóis com propriedades antifúngicas. De fato, foi demonstrado que a presença de açúcares pode ter um efeito antagonista na atividade antifúngica dos polifenóis, promovendo o crescimento de fungos.

[0036] A invenção também se refere a um extrato de biomassa rico em polifenol obtido pelo processo de acordo com a invenção. Estes extratos têm, vantajosamente, 4 moléculas de interesse que são polifenóis da família dos estilbenos. Essas 4 moléculas são trans-piceatannol, trans-resveratrol, trans-ε-viniferina e trans-vitisin. De preferência, o extrato contém pelo menos 2 vezes mais trans-ε-viniferina (ou pelo menos 2,5 vezes mais) pelo menos 3 vezes mais trans-vitisin (ou pelo menos 6 vezes mais) do que um extrato etanólico convencional.

[0037] A invenção também se refere a um extrato de biomassa rico em polifenol obtido pelo processo de acordo com a invenção para uma biomassa que consiste em partes secas de plantas do gênero *Vitis*, em particular *Vitis labrusca*, *Vitis riparia*, *Vitis rupestris*, *Vitis berlandieri*, *Vitis amurensis*, *Vitis coignetiae*, *Vitis vulpina*, *Vitis acerifolia*, *Vitis aestivalis*, *Vitis rotundifolia* e mais

particularmente *Vitis vinifera*. De acordo com uma modalidade preferida da invenção, o extrato rico em polifenóis é um extrato de sarmentos, mais particularmente de ramos de *Vitis vinifera*.

[0038] Os extratos de acordo com a invenção têm propriedades fungicidas, bactericidas e antioxidantes, como mostrado pelos exemplos para um extrato de ramos de *Vitis vinifera*.

[0039] Os extratos de acordo com a invenção, em particular os extratos de rebentos, são ativos como fungicidas para controlar (prevenir) o desenvolvimento de fungos nocivos em alimentos e agricultura, tais como contaminantes em frutos enlatados (*Byssochlamys nivea*), ou doenças de árvores frutíferas, vegetais e plantas, como o câncer da maçã (*Nectria galligena*), podridão parda de árvores frutíferas (*Monilinia fructicola, Monilinia fructigena* e *Monillinia laxa*), ferrugem da folha de cenoura (*Alternaria daucil*), descamação prateada de batata (*Helminthosporium solani*), fusariose (*Gibberella zeae*), ferrugem da orelha (*Fusarium culmorum*), mancha foliar da septoria em trigo (*Mycosphaerella graminicola*), ou várias podridões (incluindo *Penicillium digitatum, Penicillium italicum, Phytophthora syringae* ou *Rhizopus stolonifer*).

[0040] A invenção se refere também a um método para o tratamento fungicida de plantas para prevenir ou controlar

o desenvolvimento de fungos patogênicos nas referidas plantas, o referido processo compreendendo aplicar às referidas plantas uma quantidade eficaz de extrato de acordo com a invenção, em particular extrato de ramos como definido acima e nos exemplos.

[0041] As plantas tratáveis com os extratos de acordo com a invenção são vantajosamente plantas cultivadas para consumo humano, tais como jardinagem, colheitas de batata, colheitas de campo, tais como culturas de cereais, em particular cevada, trigo e milho, soja ou culturas de oleaginosas, tais como colza, girassol, linho, cânhamo ou algodão. O tratamento também pode ser aplicado a árvores frutíferas, particularmente macieiras, pereiras, damascos, pessegueiros e videiras.

[0042] A aplicação às plantas é realizada conforme a necessidade, seja como medida preventiva, quando as condições climáticas são favoráveis ao desenvolvimento de fungos, seja como medida curativa após o surgimento de doenças. A aplicação será geralmente realizada usando métodos de pulverização padrão. O especialista será capaz de determinar quando e como tratar as plantas com um extrato de acordo com a invenção, usado sozinho ou em mistura com outros produtos conhecidos pelas suas propriedades fungicidas, tais como sulfato de cobre, calda bordalesa ou outros produtos fitofarmacêuticos da indústria agroquímica. Vantajosamente,

o tratamento é realizado sem o uso de produtos fitofarmacêuticos da indústria agroquímica, para agricultura orgânica ou biodinâmica.

[0043] A invenção também se refere a um método para prevenir e/ou tratar a degradação de frutos e plantas após a colheita, em particular o desenvolvimento de podridão fúngica, o referido processo compreendendo aplicar aos referidos frutos e plantas uma quantidade apropriada de extrato obtenível pelo processo de acordo com a invenção como definido acima e nos exemplos.

[0044] Através destas propriedades antioxidantes, os extratos de acordo com a invenção, em particular os extratos de sarmentos, podem também ser utilizados para preservar composições alimentares ou composições cosméticas.

[0045] Pela sua capacidade de retardar a oxidação dos frutos após a colheita, o extrato de acordo com a invenção, em particular o extrato de videira, pode ser utilizado para prevenir e/ou tratar o estresse oxidativo nas plantas, por aplicação a estas plantas ou partes de plantas, em particular, frutas sensíveis à oxidação, como bananas ou frutas exóticas ou tropicais, como manga, maracujá, etc., que são sensíveis ao estresse oxidativo quando armazenadas em baixas temperaturas, menores do que as encontradas em seu ambiente natural. A invenção também diz respeito ao uso do extrato de acordo com a invenção, em particular o extrato de

sarmento, ou uma composição contendo o mesmo para a prevenção e/ou tratamento de estresse oxidativo em plantas.

[0046] O extrato de acordo com a invenção, em particular o extrato de ramo, também pode ser usado por suas propriedades antioxidantes para a prevenção e tratamento de estresse oxidativo em humanos e animais.

[0047] Eles também têm atividade antibacteriana, particularmente em bactérias Gram-positivas patogênicas, enquanto preservam bactérias comensais em humanos. Eles são particularmente ativos contra bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Listeria*, *Streptococcus* e *Propionibacterium*, em particular *Propionibacterium acnes*, um patógeno responsável pela acne. Os extratos de acordo com a invenção, em particular os extratos de sarmento, têm atividade antimicrobiana de largo espectro, com maior eficácia contra agentes patogênicos da pele.

[0048] A invenção se refere, portanto, a um extrato de acordo com a invenção, particularmente um extrato de ramos, para uso em terapia, em particular para tratamento e profilaxia de infecções bacterianas, mais particularmente para tratamento e profilaxia de infecções bacterianas da pele, ainda mais particularmente para tratamento e profilaxia da acne.

[0049] A invenção também se refere a uma composição compreendendo um extrato obtenível pelo processo de acordo

com a invenção como definido acima e nos exemplos e um veículo adequado para uso.

[0050] Pode ser uma composição antifúngica para aplicação a plantas antes ou depois da colheita, ou uma composição farmacêutica. Tais composições são conhecidas e o especialista será capaz de determinar o veículo apropriado para este uso.

[0051] A presente invenção se refere em particular a uma composição fitossanitária compreendendo pelo menos o extrato como descrito acima e pelo menos um agente de formulação compatível. Esta composição fitossanitária pode estar na forma seca, por exemplo, na forma de pó ou na forma granular, ou na forma líquida, por exemplo, na forma de suspensão, dispersão concentrada ou não concentrada, gel, emulsão, etc.

[0052] O agente de formulação é um agente natural ou um derivado da química sintética e convencionalmente utilizado em composições de fitossanidade.

[0053] O agente de formulação pode ser um dispersante, um estabilizante, um agente tensoativo, um conservante, um agente umectante, um agente de adesão, um tampão, um regulador de pH, um fotoprotetor, etc. Podem ser utilizados sozinhos ou em mistura.

[0054] O extrato obtenível pelo processo de acordo com a invenção, bem como as composições que o contêm, são

adequados, em particular, para uso na prevenção e tratamento de infecções fúngicas em frutos e plantas após a colheita.

[0055] O processo de acordo com a invenção compreende a implementação de várias técnicas combinadas no mesmo meio de extração. Cada técnica (ondas eletromagnéticas, ultrassom, vácuo) e os meios para a sua implementação são bem conhecidos (WO 2012/045923, EP 2 530 059, FR 2 976 062). O especialista será capaz de adaptar sistemas de extração hidroalcoólica existentes para biomassa seca para aplicar estes tratamentos associados.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0056] A Figura 1 mostra uma comparação das quantidades relativas de trans-piceatannol, trans-resveratrol, trans-ε-viniferina e trans-vitisin contidas em um extrato obtido pelo processo de acordo com a invenção e em um extrato obtido por um processo convencional. Os valores apresentados representam as concentrações relativas (em unidades arbitrárias) de cada uma das 4 moléculas, calculadas a partir das áreas sob a curva dos picos de HPLC.

[0057] A Figura 2 mostra a comparação da atividade antifúngica de um extrato obtido pelo processo de acordo com a invenção (círculos) e um extrato obtido por um processo convencional (quadrados). Os valores apresentados são a média, em 3 condições idênticas, da eficácia (0% = crescimento fúngico normal; 100% = ausência de crescimento

fúngico) aos 4 dias pós-inoculação, em função da concentração do extrato.

EXEMPLOS

Exemplo 1, preparação de um extrato ecológico de ramos de *Vitis vinifera*:

[0058] O material vegetal de partida é o ramo de *Vitis vinifera* (ramos de agosto). Os ramos são secos (ao ar livre ou em forno). Depois de secos, os ramos são primeiro triturados em fragmentos de 2 a 10 cm e depois triturados finamente até um tamanho de partícula compreendido entre 1 e 5 mm. O pó do ramo de *Vitis vinifera* assim obtido é extraído em uma solução aquosa ou etanólica a 30%. O tempo de extração é compreendido entre 30 minutos e 1 hora e 30 minutos, de um modo preferido de 45 minutos a 60 minutos. As técnicas utilizadas para extrair são micro-ondas, ultrassom, vácuo e agitação simultânea. O extrato assim obtido é filtrado a vácuo através de um filtro de 20 mícrons. O extrato é então evaporado sob vácuo e seco por aspersão ou liofilizado. O extrato seco assim obtido é então armazenado à temperatura ambiente longe da luz.

Exemplo 2, caracterização química do extrato de ramos de *Vitis vinifera* preparado de acordo com o Exemplo 1:

[0059] Cinco miligramas do extrato seco ecológico de *Vitis vinifera* liofilizado obtido de acordo com o Exemplo 1 foram dissolvidos em 1 ml de etanol a 50%. A solução é

solubilizada e depois centrifugada durante 10 minutos a 12000 RCF antes de ser injetada em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência/espectrometria de massa (HPLC-MS) nas seguintes condições. O volume de extrato injetado é de 25 µl. Os solventes de migração são água ultrapura (0,1% de ácido fórmico) e acetonitrila (0,1% de ácido fórmico). A separação é feita em 55 minutos a 1 ml/min de acordo com o seguinte gradiente de solvente:

Tempo (min)	Acetonitrila (%)	Água (%)
0	5	95
0,1	5	95,00
45	50	50,00
46	100	0,00
51	100	0,00
52	5	95,00
55	5	95,00

[0060] A coluna utilizada contém uma fase estacionária enxertada com funções C18. A detecção de UV é realizada entre 200 e 800 nm. A detecção de massa é executada pelo ESI de modo negativo. São obtidos quatro compostos principais cujos tempos de retenção, absorbâncias e massas moleculares são mostrados na tabela abaixo.

Composto	Tempo de retenção (min)	Absrobância máxima (nm)	Massa molecular (g/mol)
trans-Piceatannol	19	306 a **323**	244
trans-Resveratrol	23	**306** a 323	228

trans-ε-Viniferina	30	306 a **323**	454
trans-Vitisin	36	306 a **327**	906

[0061] A comparação do conteúdo destes 4 compostos com um extrato etanólico convencional é mostrada na Figura 1.

Exemplo 3, ação antifúngica contra *Botrytis cinerea*:

[0062] Os esporos de *Botrytis cinerea* são depositados no fundo dos poços de placas de 96 poços transparentes, nos quais o meio nutriente ágar foi previamente vertido.

[0063] O extrato seco ecológico de ramo de *Vitis vinifera* liofilizado obtido de acordo com o Exemplo 1, dissolvido a diferentes concentrações (0 g/l, 2,5 g/l, 5 g/l, 10 g/l, 20 g/l e 30 g/l) em 8% de etanol, é então depositado nos poços.

[0064] Após vários períodos de incubação a 21 °C e longe da luz, mede-se a densidade relativa do micélio em cada poço por meio de absorvência a 800 nm. A eficácia antifúngica é então calculada a partir destes valores de absorbância.

[0065] A eficácia antifúngica, observada aos 4 dias de incubação, de um extrato obtido com o processo de acordo com a invenção e um extrato obtido com um processo

convencional é mostrada na Figura 2. Os resultados são semelhantes aos apresentados na Figura 2 até pelo menos 15 dias de incubação.

Exemplo 4, ação antifúngica

[0066] As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para uma eficiência de 100% até 240 horas foram medidas com o extrato de acordo com o Exemplo 2 em diferentes cepas fúngicas. Os resultados estão detalhados na tabela abaixo.

Fungo	**CIM g/L**
Byssochlamys nivea	28
Nectria galligena	13
Monillinia laxa	8
Alternaria dauciI	7
Helminthosporium solani	2
Gibberella zeae	9
Fusarium culmorum	9
Mycosphaerella graminicola	1

Exemplo 5, ação antibacteriana

[0067] As CIMs do extrato do Exemplo 2 foram determinadas para diferentes espécies bacterianas. Os testes são realizados em 27 cepas bacterianas listadas na tabela abaixo. O estudo é realizado em meio nutriente rico, com uma concentração de colônias testadas calibradas a 5.10^5-10^6 UFC/mL.

Bactéria	**MIC mg/ML**
Bacillales	
Bacillus cereus	0,234
Bacillus subtilis	0,938
Staphylococcus aureus	0,469

S. aureus MR (MRSA)	0,469
Staphylococcus epidermidis	0,234
Listeria monocytogenes	0,469
Lactobacillus	
Enterococcus hirae	0,469
Lactobacillus acidophilus	7,5
Lactobacillus casei	7,5
Lactobacillus plantarum	> 7,5
Streptococcus mutans	3,75
Streptococcus pyogenes	0,234
Streptococcus suis	0,469
Selenomonadales	
Veillonella dispar	0,938
Clostridiales	
Clostridium difficile	0,938
Enterobacteriales	
Salmonella enterica typhimurium	1,875
Escherichia coli	7,5
Yersinia enterocolitica	3,75
Vibrionales	
Vibrio cholerae	0,938
Vibrio anguillarum	> 7,5
Campylobacterales	
Campylobacter jejuni	1,875
Bacteroidales	
Bacteroides fragilis	3,75
Bifidobacteriales	
Bifidobacterium breve	1,875
Bifidobacterium lactis	1,875
Bifidobacterium longum longum	0,938
Actinomycetales	
Actinomyces naeslundii	3,75
Propionibacterium acnes	0,117

[0068] O extrato do Exemplo 2 mostra atividade inibidora em todas as cepas testadas exceto *Lactobacillus plantarum* e *Vibrio anguillarum*. A cepa mais sensível testada é *P. acnes*, um patógeno responsável pela acne. Finalmente, bactérias da ordem Bacillales, *Enterococcus sp.* e certos

Streptococcus sp., são os mais sensíveis ao extrato de acordo com o Exemplo 2. Por outro lado, as outras cepas testadas são menos sensíveis, em particular as bactérias benéficas *Bifidobacterium sp.* e *Lactobacillus sp.*, bem como bactérias Gram-negativas.

[0069] O extrato do Exemplo 2 é um antimicrobiano de amplo espectro com maior eficácia em patógenos da pele.

Exemplo 6, atividade antioxidante

[0070] A atividade antioxidante do extrato do Exemplo 2 é estudada comparando o estado da pele das bananas mantidas ao ar livre com ou sem aplicação do extrato do Exemplo 2 aos 7 dias e 9 dias após a aplicação.

[0071] Sem a aplicação do extrato do Exemplo 2, cascas de banana cobertas com manchas pardas características da sua oxidação são observadas aos 7 dias, enquanto as cascas das bananas tratadas são ligeiramente afetadas (1 mancha característica).

[0072] Aos 9 dias, a oxidação da pele das bananas não tratadas continua com áreas negras inteiras do revestimento das manchas observadas aos 7 dias, enquanto a pele das bananas tratadas muda pouco da observação aos 7 dias.

[0073] Esta atividade antioxidante observada em bananas mostra o interesse do extrato de acordo com a invenção para tratar o estresse oxidativo em plantas,

especialmente para frutos exóticos ou tropicais.

REFERÊNCIAS

- Alexa, E., Poiana, M. A. & Sumalan, R. M. Mycoflora and ochratoxin a control in wheat grain using natural extracts obtained from wine industry by-products. Int. J. Mol. Sci. 13, 4949 a 4967 (2012).

- Casazza, A. a., Aliakbarian, B., Mantegna, S., Cravotto, G. & Perego, P. Extraction of phenolics from Vitis vinifera wastes using non-conventional techniques. J. Food Eng. 100, 50 a 55 (2010).

- Favaron & Lucchetta, Role of grape polyphenols on trans-resveratrol ativity against Botrytis Cinerea and of fungal Lacasse on the solubility of putatibe grapepr proteins J. of Plant Pathology vol 91, No. 3, 579 a 588 (2009)

- Goupil, P. *et al*. Grape marc extract acts as elicitor of plant defence responses. Ecotoxicology 21, 1541 a 1549 (2012).

- Luque-Rodriguez *et al*. Extraction of polyphenols from Vine shoots of Vitis vinifera by Superheated Ethanol-Water Mixtures J. of Agriculture and Food Chemistry vol 54, No. 23, 8775 a 8781 (2006)

- Osorio & al Biological efficiency of polyphenolic extracts from pecan nuts shell (Carya Illinoensis), pomegranate husk (Punica granatum) and creosote bush leaves (Larrea tridentate Cov.) against plant pathogen fungi

Industrial Crops and Products, col 31, No. 1, 153 a 157 (2010),

- Pezet, R., Gindro, K., Viret, O. & Spring, J. L. Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew. Physiol. Mol. Plant Pathol. 65, 297 a 303 (2004).

- Quan, P. T., Hang, T. Van, Ha, N. H., De, N. X. & Tuyen, T. N. Microwave-assisted extraction of polyphenols from fresh tea shoot. Sci. Technol. Dev. 9, 69 a 75 (2006).

- Sanchez, J. B. J., Orea, J. M., Gonzalvez, A. G. & Urena, A. G. On the Use of the Own Plant's Defence Compounds to Maintain the Post-Harvest Fruit Quality. Open Agric. J. 43 a 48 (2008).

- CN 104 177 463, CN 104 435 135, CN 102 757 512, CN 104 256 432, CN 104 256 641, CN 103 783 506, CN 102 757 509, CN 101 816 349, CN 19 35 947, CN 205 759 861, CN 103 875 842

- EP 2 530 059

- FR 2 976 062

- JP 2016 102192

- WO 2012/045923,

- US 5.989.557, US 2012/0142105.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para preparar um extrato rico em polifenóis de biomassa vegetal seca compreendendo (a) uma etapa de extração da biomassa seca colocando-a em contato com um solvente aquoso e (b) uma etapa de recuperação da fase aquosa enriquecida com polifenol, **caracterizado** pelo fato de que na etapa de extração (a), a mistura de biomassa vegetal/solvente aquoso é tratada simultaneamente ou sequencialmente por

i) ondas eletromagnéticas com frequências que variam entre 915 MHz e 28 GHz, e

ii) agitação da mistura, e/ou

iii) pressão de 5.000 a 95.000 Pa (50 a 950 mbar).

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o solvente aquoso é água ou uma mistura de etanol/água compreendendo de 10 a 70% em volume de etanol.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que o solvente aquoso é uma mistura de etanol/água compreendendo de 30 a 50% de etanol.

4. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que a proporção em massa da biomassa vegetal seca para o solvente aquoso é de 1/5 a 1/30.

5. Processo, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que a proporção em massa da

biomassa vegetal seca para o solvente aquoso é de 1/10 a 1/20.

6. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 3, **caracterizado** pelo fato de que a frequência das faixas de ondas eletromagnéticas varia de 915 MHz a 2,45 GHz.

7. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 6, **caracterizado** pelo fato de que a potência das faixas de ondas eletromagnéticas varia de 300 W a 100 kW.

8. Processo, de acordo com a reivindicação 7, **caracterizado** pelo fato de que a potência das faixas de ondas eletromagnéticas varia de 1 a 75 kW.

9. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 8, **caracterizado** pelo fato de que a etapa de extração (a) compreende adicionalmente um tratamento ultrassônico (iv) cuja faixa de frequência varia de 25 kHz a 1 MHz.

10. Processo, de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de que a faixa de potência ultrassônica varia de 200 a 4000 W.

11. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, **caracterizado** pelo fato de que a biomassa vegetal consiste em sarmentos de Vitis sp.

12. Processo, de acordo com qualquer uma das

reivindicações de 1 a 11, **caracterizado** pelo fato de compreender uma etapa (c) de concentração dos polifenóis por evaporação parcial ou total do solvente aquoso.

13. Processo, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que a concentração (c) é obtida por meio da liofilização da fase aquosa recuperada.

14. Extrato rico em polifenol **caracterizado** pelo fato de ser obtenível pelo processo conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 13.

15. Composição **caracterizada** pelo fato de compreender um extrato conforme definido na reivindicação 14 e um veículo adequado para seu uso.

16. Uso de um extrato conforme definido na reivindicação 14 ou de uma composição conforme definida na reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de ser para prevenção e tratamento de infecções fúngicas em plantas.

17. Uso de um extrato conforme definido na reivindicação 14 ou de uma composição conforme definida na reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de ser para prevenção e tratamento de infecções fúngicas em frutas e plantas após a colheita.

18. Uso de um extrato conforme definido na reivindicação 14 ou de uma composição conforme definida na reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de ser para prevenção e/ou tratamento do estresse oxidativo em plantas.

19. Uso de um extrato conforme definido na reivindicação 14 ou de uma composição conforme definida na reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de ser como um agente antioxidante em uma composição cosmética ou alimentícia.

20. Extrato, de acordo com a reivindicação 14, ou composição, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de ser para uso em terapia.

21. Extrato, de acordo com a reivindicação 14, ou composição, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de ser para uso no tratamento de infecções de pele.

22. Extrato, de acordo com a reivindicação 14, ou composição, de acordo com a reivindicação 15, para uso, de acordo com a reivindicação 21, **caracterizado** pelo fato de que a infecção da pele é acne.

23. Extrato, de acordo com a reivindicação 14, ou composição, de acordo com a reivindicação 15, **caracterizado** pelo fato de ser para uso no tratamento de estresse oxidativo em humanos ou animais.

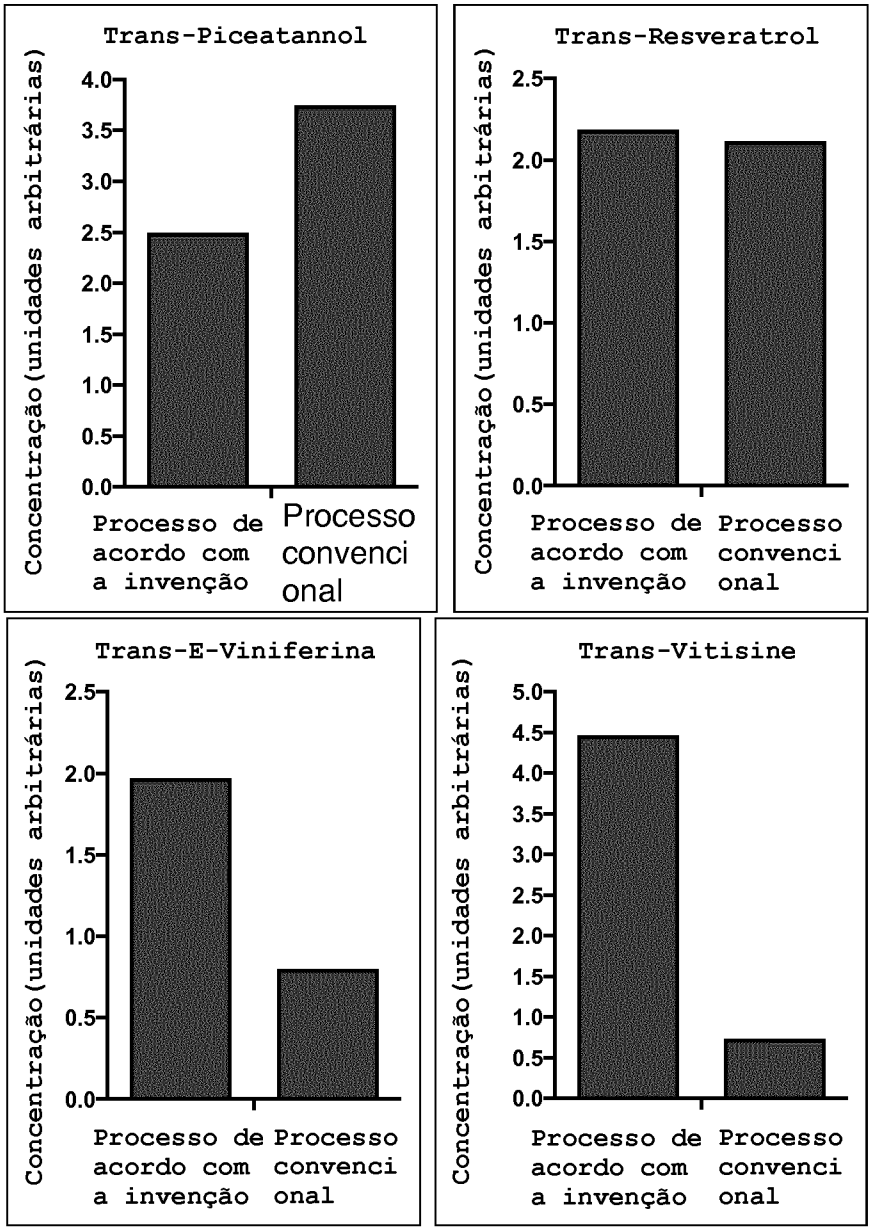
Trans-Piceatannol
Concentração(unidades arbitrárias)
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Processo de acordo com a invenção
Processo convencional
Trans-Resveratrol
Concentração(unidades arbitrárias)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Processo de acordo com a invenção
Processo convencional
Trans-E-Viniferina
Concentração(unidades arbitrárias)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Processo de acordo com a invenção
Processo convencional
Trans-Vitisine
Concentração(unidades arbitrárias)
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Processo de acordo com a invenção
Processo convencional

Fig .1

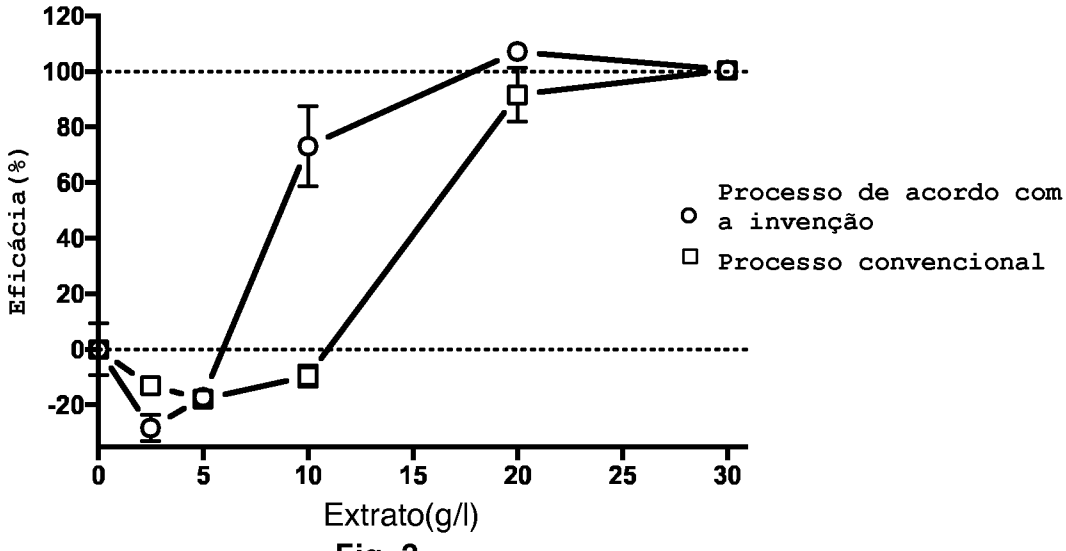
Eficácia(%)
120
100
80
60
40
20
0
-20
0
5
10
15
20
25
30
Extrato(g/l)
Processo de acordo com a invenção
Processo convencional

Fig. 2

Resumo da Patente de Invenção para: "**PREPARAÇÃO DE UM EXTRATO DE BIOMASSA SECA RICO EM POLIFENÓIS**"

A presente invenção se refere a um processo para preparar um extrato rico em polifenóis de biomassa vegetal seca, em particular partes de videiras, o extrato obtido e seu uso para aplicações antifúngicas, em particular para a prevenção e tratamento de infecções fúngicas em frutas e plantas após a colheita, mas também para aplicações relacionadas às suas propriedades antibacterianas e antioxidantes.