



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETA' INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101996900488242
Data Deposito	03/01/1996
Data Pubblicazione	03/07/1997

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	23	N		

Titolo

PRODUZIONE E PURIFICAZIONE DI ESTRATTI, CONTENENTI ANTOCIANINE ED ALTRE SOSTANZE ANTIOSSIDANTI, DA SUCCHI E POLPE DI ARANCE PIGMENTATE (CITRUS SINENSIS VARIETA' MORO, TAROCCO, SANGUINELLO) E LORO UTILIZZO IN CAMPO FARMACEUTICO, ALIMENTARE E COSMETICO.

0196 A0001

Descrizione del brevetto di invenzione industriale dal titolo "Produzione e purificazione di estratti, contenenti antocianine ed altre sostanze antiossidanti, da succhi e polpe di arance pigmentate (*Citrus sinensis* Varietà Moro, Tarocco, Sanguinello) e loro utilizzo in campo farmaceutico, alimentare e cosmetico." a nome dei Sig.ri Zappalà Gianluca (di nazionalità italiana), residente in Via Fratelli Bandiera 13 Gravina di Catania e Putrino Giacoma (di nazionalità italiana), residente in Via Filocomo 69 Catania.

Riassunto

Il brevetto riguarda l'estrazione delle antocianine e delle altre sostanze ad attività antiossidante come flavanoni (esperidina e narirutina), acidi idrossicinnamici (caffeico, cumarico, ferulico, sinapico) ed acido ascorbico contenuti nel succo o in soluzioni acquose provenienti dal lavaggio delle polpe (pulp wash), ottenuti dalla trasformazione industriale delle arance pigmentate "Moro", "Tarocco" e "Sanguinello". Queste sostanze possono essere recuperate dal succo o dalle soluzioni acquose provenienti dal lavaggio delle polpe (pulp wash) mediante un procedimento comprendente i seguenti stadi condotti in successione:

- a) trattamento enzimatico (con enzima pectolitico Cytrozim L o enzima simile), del succo o della soluzione proveniente da pulp wash ;
- b) filtrazione o decantazione della soluzione ottenuta;



IL DIRIGENTE SUPERIORE
(Dr. Michele P. Agata)

Zappalà Gianluca
Putrino Giacoma

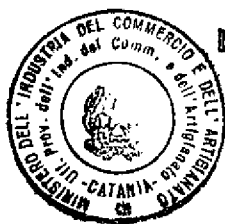
- c) passaggio delle soluzioni provenienti dallo stadio "a" su resina polimerica adsorbente per l'estrazione delle antocianine e delle altre sostanze antiossidanti;
- d) lavaggio della resina caricata, con acqua o etanolo;
- e) eluizione delle antocianine e di altri antiossidanti con alcool o soluzioni idroalcoliche acide;
- f) distillazione dell'alcool e liofilizzazione o spray-dryer dell'estratto acquoso;
- g) purificazione dell'estratto mediante cromatografia su colonna di resina in fase inversa C18 o polivinilpolipirrolidone o Sephadex LH 20.

Gli estratti ottenuti con tale procedimento, valutati con opportuni modelli sia in vitro che in vivo, hanno dimostrato di possedere una notevole attività antiossidante tale da suggerirne il potenziale utilizzo in campo farmaceutico, cosmetico ed alimentare.

Descrizione

Le tre cultivar di arance pigmentate "Moro", "Tarocco" e "Sanguinello" sono coltivate esclusivamente in Italia ed in particolare in Sicilia e si distinguono dal gruppo delle arance bionde per la presenza nella polpa di pigmenti rossi appartenenti alla classe delle antocianine.

Dai dati riportati in letteratura emerge che nel succo delle suddette cultivar sono presenti circa dieci antocianine, di cui la cianidina-3-



IL DIRIGENTE SUPERIORE
(Dr. Michele Agata)

Leppore Giuseppe
Petrino Giacomo

glucoside risulta essere presente in concentrazione più elevata (40-60% del totale delle antocianine presenti). L'aglicone cianidina costituisce circa l'80% degli agliconi totali. Sono state identificate, inoltre, alcune antocianine acilate con acidi idrossicinnamici (Maccarone et al., 1983, 1985). Oltre alle antocianine, sono presenti nel succo altre sostanze antiossidanti quali l'acido ascorbico, gli acidi idrossicinnamici caffeico, cumarico, ferulico e sinapico, esperidina e narirutina.

I risultati riportati in letteratura da diversi autori (Tsuda T. et al., 1994; Wattenberg L.W. et al., 1980; Newmark H.L. et al., 1992; Attaway J.A. et al., 1991) circa l'attività biologica e farmacologica delle antocianine, dei flavonoidi e degli acidi idrossicinnammici, ci hanno indotto a realizzare un processo per la loro estrazione dal succo delle arance pigmentate o dalle soluzioni provenienti dal lavaggio delle loro polpe.

La metodologia adottata è stata quella dell'estrazione in fase solida mediante resina adsorbente macroporosa a matrice polimerica.

Il succo o le soluzioni provenienti dal lavaggio delle polpe, previamente filtrate, sono state fatte passare su un letto di resina ad una velocità spaziale tale da permettere l'adsorbimento selettivo delle antocianine e delle altre sostanze sopramenzionate (flavonoidi, acidi cinnammici, acido ascorbico).

Dopo la fase di caricamento, le sostanze, di cui sopra, sono state eluite, dalla resina, con alcool etilico o soluzioni idro-alcoliche acide.

Più in particolare, in accordo con la presente invenzione le



3

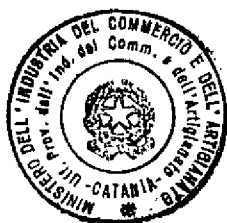
IL DIRIGENTE SUPERIORE
(Dr. Michele P. Agosta)

Zappalò Girolamo
Petrino Giacomo

antocianine e le altre sostanze presenti in succhi o estratti di polpe (pulp wash) vengono recuperati mediante un procedimento comprendente i seguenti stadi condotti in successione:

- a) trattamento enzimatico del succo o della soluzione proveniente da pulp wash con enzima pectolitico (Cytrozim L o enzima similare);
- b) filtrazione o decantazione del succo (o estratti di polpe) proveniente dalla trasformazione industriale di arance pigmentate "Moro", "Tarocco" e "Sanguinello";
- c) passaggio della soluzione proveniente dallo stadio "b" su resine adsorbenti a matrice macroporosa stirene-divinilbenzene, con porosità compresa tra 30 e 70%, diametro dei pori da 25 a 200 Å (Angstrom), area superficiale da 200 a 800 m²/g, non polari o debolmente polari;
- d) lavaggio della resina con acqua o etanolo;
- e) eluizione delle antocianine e delle altre sostanze antiossidanti con alcool o soluzioni idro-alcooliche acide;
- f) distillazione dell'alcool e liofilizzazione o spray-dryer dell'estratto acquoso;
- g) purificazione dell'estratto mediante cromatografia su una delle seguenti colonne: resina C18, polivinilpolipirrolidone, sephadex LH-20.

Le resine adsorbenti a matrice polimerica sono utilizzate nelle industrie agrumarie di molti Paesi produttori di agrumi per deamarizzare i succhi cioè per eliminare quei componenti che conferiscono al prodotto un sapore amaro (limonina, naringina)(Kimball D.A., Norman S.I., 1990; Matthews R. F., et al.,



4
IL DIRIGENTE SUPERIORE
(Dr. Michela D'Agata)

Lopolo Genluce
Petrino Giacomina

1990; Couture R., Rouseff R., 1992; Hernandez E. et al., 1992).

Tra le differenti resine, da noi utilizzate per la produzione degli estratti oggetto del presente brevetto, la XAD 16 prodotta dalla "Rohm and Haas" risulta particolarmente interessante. Essa infatti presenta il vantaggio, rispetto alle altre, di avere già ottenuto l'approvazione, per l'impiego in campo alimentare, dalla Food and Drug Administration (FDA 21 CFR 173.65). Oltre alla suddetta resina, sono state utilizzate anche altre resine polimeriche adsorbenti come la S-861, della "Rohm and Haas" e la S-112 della "Dow Chemical".

Facendo passare il succo o l'estratto delle polpe su un letto delle suddette resine, secondo lo stadio "c", le antocianine e le altre sostanze antiossidanti presenti nel succo o nelle soluzioni provenienti dal lavaggio delle polpe, vengono quantitativamente e selettivamente adsorbite, naturalmente con efficienze differenti che dipendono dalla natura della resina.

Una volta caricata, la resina viene lavata, secondo lo stadio "d", con acqua o con alcool per allontanare principalmente gli zuccheri, l'acido citrico, le pectine ed altre sostanze non adsorbite nella resina.

In accordo con lo stadio "e" della presente invenzione, le antocianine e le altre sostanze antiossidanti assorbite sulla resina vengono eluite in modo quantitativo utilizzando alcool etilico (o metilico) contenente 1-10% di acido citrico o con una soluzione idroalcolica con concentrazioni di alcool comprese tra il 10 e l'80%, acidificata con acido citrico.

Il recupero delle antocianine e delle altre sostanze antiossidanti



5
IL DIRIGENTE SUPERIORE
(Dr. Michele Di S. data)

Zeppolo Giuseppe
Petrino Giacomo

viene effettuato mediante allontanamento dell'alcool dalla soluzione per distillazione e successiva liofilizzazione dell'estratto acquoso o essiccamento a polverizzazione (spray-dryer).

L'estratto secco contenente le antocianine e le altre sostanze antiossidanti, può essere ulteriormente purificato mediante ridissoluzione con acqua e passaggio su colonna cromatografica contenente resina C18 o polivinilpolipirrolidone o sephadex LH 20, utilizzando come solventi rispettivamente metanolo-acido acetico-acqua (65-15-20), metanolo all'1% di HCl e acqua-acido citrico (90-10).

In tal modo è possibile ottenere estratti notevolmente arricchiti di antocianine e delle altre sostanze antiossidanti.

Gli esempi che seguono sono riportati unicamente a scopo illustrativo e non devono essere intesi come limitativi della portata dell'invenzione stessa.

Esempio n°1.

Un campione di succo pigmentato di provenienza industriale previamente filtrato, avente le caratteristiche riportate in Tabella 1, è stato fatto passare in una colonna di vetro (diametro 3,0 cm) contenente 500 ml di una resina polimerica adsorbente non ionica, idrofobica, reticolata polistirene-divinilbenzene, prodotta e commercializzata con la denominazione XAD 16 dalla Rohm and Haas.

La portata di alimentazione in colonna è stata regolata mediante l'uso di una pompa peristaltica e mantenuta a 1500 l/h (3BV/h)



IL DIRIGENTE SUPERIORE
(Dr. Michele *Agata*)

Leppete *Giuseppe*
Petrino *Giuseppe*

(BV=Bed Volumes; 1BV=500ml).

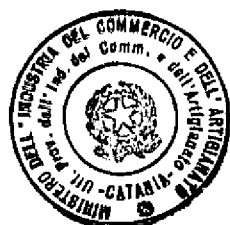
La fase di assorbimento è stata interrotta quando la soluzione (succo) all'uscita dalla colonna presentava un contenuto di antocianine di circa un decimo (25-30 mg/l) rispetto a quello della soluzione in entrata.

In totale il volume di succo passato su resina è stato di 20 litri (40 BV). Al termine, la resina è stata lavata con 1000 ml di acqua mantenendo sempre la portata a 1500 ml/h (3BV/h).

Le antocianine e le altre sostanze assorbite sulla resina sono state eluite quantitativamente con 1000 ml di una soluzione costituita da acqua-alcool etilico 50:50 contenente 1% di acido citrico. La portata di eluizione è stata mantenuta a 500 ml/h (1 BV/h) mediante una pompa peristaltica.

I primi 500 ml (1°BV) di eluato ottenuti contenevano: 8000 mg/l di antocianine, 9.500 mg/l di narirutina, 8.500 mg/l di esperidina, 450 mg/l di acido caffeico, 3.250 mg/l di acido cumarico, 4.550 mg/l di acido ferulico, 1.750 mg/l di acido sinapico e 9.500 mg/l di acido ascorbico.

Le metodiche analitiche utilizzate (HPLC) per le suddette determinazione sono riportate in letteratura (antocianine : Rapisarda P. et al. ,1994; acidi idrossicinnamici: Rouseff R., et al. 1992; acido ascorbico: Monsalve A., et al. 1990; flavanoni: Rouseff R., et al. 1987.) Un campione di succo pigmentato previamente filtrato ed avente caratteristiche riportate in Tabella 1, è stato fatto passare in una colonna di vetro (diametro 3,0 cm) contenente 500 ml di resina



7
IL DIRIGENTE SUPERIORE
(Dr. Michele D. Agata)

Zeppale Giuseppe

Petrino Giacomo

polimerica adsorbente, non ionica, reticolata, polistirene-divinilbenzene prodotta e commercializzata, con la denominazione Duolite S-861, dalla Rohm and Haas.

La portata di alimentazione è stata regolata mediante l'uso di una pompa peristaltica e mantenuta a 1500 ml/h (3 BV/h).

La fase di assorbimento è stata interrotta quando la concentrazione delle antocianine della soluzione (succo) all'uscita della colonna era circa un decimo (25-30 mg/l) rispetto a quella in entrata.

In totale il succo passato su resina è stato di 15 litri (30 BV).

Le antocianine e le altre sostanze assorbite sulla resina sono state eluite con 1000 ml (2 BV) di una soluzione costituita da acqua-alcool etilico 50:50 contenente l'1% di acido citrico. La portata di eluizione è stata mantenuta a 500 ml/h (1 BV/h) mediante l'uso di una pompa peristaltica.

I primi 500 ml (1°BV) di eluato contenevano: 6.500 mg/l di antocianine, 8.200 mg/l di narirutina, 8.700 mg/l di esperidina, 410 mg/l di acido caffeico, 2.350 mg/l di acido cumarico, 3.200 mg/l di acido ferulico, 950 mg/l di acido sinapico e 7600 mg/l di acido ascorbico.

Esempio n°3

Un campione di succo pigmentato previamente filtrato, avente caratteristiche riportate in Tabella 1, sono stati fatti passare in una colonna di vetro (diametro 3,0 cm) contenente 500 ml di resina polimerica adsorbente, non ionica, reticolata polistirene-divinilbenzene prodotta e commercializzata, con la denominazione



8
IL DIRIGENTE SUPERIORE
(Dr. Michele Agata)

Zeppè Girolamo
Putrino Giacomina

Kastel S-112, dalla Dow Chemical.

La portata di alimentazione è stata regolata mediante una pompa peristaltica e mantenuta a 1500 ml/h (3 BV/h).

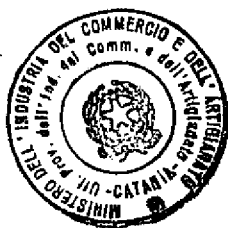
La fase di assorbimento è stata interrotta quando la concentrazione delle antocianine della soluzione (succo) all'uscita della colonna era circa un decimo (25-30 mg/l) rispetto a quella in entrata.

In totale la quantità di succo passata sulla resina è stata 20 litri (40 BV).

Le antocianine e le altre sostanze assorbite sulla resina sono state eluite quantitativamente con 1000 ml (1 BV) di una soluzione costituita da acqua-alcool etilico 50:50 contenente l'1% di acido citrico. La portata di eluizione è stata mantenuta a 500 ml/h (1 BV/h) mediante l'uso di una pompa peristaltica.

I primi 500 ml (1°BV) di eluato ottenuti presentavano le seguenti concentrazioni : 9.000 mg/l di antocianine, 10.750 mg/l di narirutina, 9.850 mg/l di esperidina, 485 mg/l di acido caffeico, 3.630 mg/l di acido cumarico , 4.870 mg/l di acido ferulico, 1.930 mg/l di acido sinapico e 10.800 mg/l di acido ascorbico.

Il recupero delle antocianine e delle altre sostanze dalle soluzioni idroalcoliche, ottenute applicando i procedimenti descritti sopra, può essere effettuato mediante una fase di distillazione dell'alcool etilico ed una successiva operazione di liofilizzazione od essiccamento a polverizzazione (spray-dryer) dell'estratto acquoso.



IL DIRIGENTE SUPERIORE
(Dr. Michele D'Agata)

Lepore Giolucca
Pantano Giacoma

Valutazione dell'attività biologica dell'estratto ottenuto.

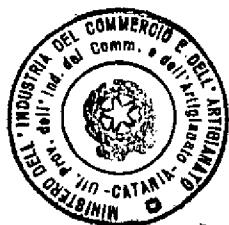
L'attività biologica è stata valutata utilizzando un estratto solido di arance pigmentate ottenuto portando a secco (per rimozione sottovuoto di acqua ed alcol) la soluzione idroalcolica di cui sopra.

Valutazione in vitro dell'attività antiossidante dell'estratto di arance pigmentate.

L'attività antiradicalica dell'estratto di antocianine da arance pigmentate è stata determinata mediante un modello riportato e descritto dettagliatamente in letteratura (Barclay L.R.C. et al. 1984; Wang P.F. et al.1992).

Il modello consiste in una dispersione micellare di sodio dodecil solfato (SDS) in cui viene inglobata una determinata quantità di acido linoleico. Questa dispersione micellare contenete l'acido linoleico costituisce un buon modello di membrana ed è utile per studiare le cinetiche di autossidazione di componenti di membrane biologiche. Si descrive qui di seguito la metodica sperimentale utilizzata.

Una soluzione di 0.1 M di SDS è stata preparata sciogliendo questo tensioattivo in una soluzione di NaH_2PO_4 ed aggiustando, con una soluzione concentrata di NaOH, il pH fino al valore di 7.4. Quindi a questa soluzione è stato aggiunto acido linoleico fino ad una soluzione finale di 0.0026 M e la soluzione così ottenuta è stata utilizzata per gli esperimenti in oggetto entro 6-8 ore dalla preparazione. A parte è stata preparata una soluzione acquosa 0.071 M di 2,2'-azobis(2-amidinopropano) che costituisce l'iniziatore



IL DIRIGENTE SUPERIORE
(Dr. Michele D'Agata)

10

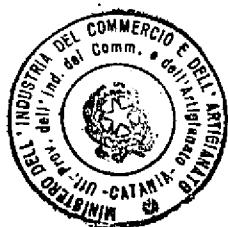
Leopoldo Giombone

Petrino Giacomone

radicalico e nello stesso tempo una soluzione di estratto di succo di arancia pigmentate, preparato come riportato in questo brevetto, contenente una concentrazione nota di antocianine (considerate come sostanze di riferimento per determinare il titolo dell'estratto). In particolare il titolo della soluzione di estratto viene fissato in antocianine totali espresse come cianidin-3-glucoside.

2 ml della soluzione micellare di acido linoleico, in una cella UV ed agitati vigorosamente mediante un piccolo agitatore magnetico, sono posti in uno spettrofotometro e termostatati alla temperatura di 50°C. Il bianco è costituito dalla soluzione di SDS. Dopo 20 minuti, necessari per raggiungere l'equilibrio termico, si aggiungono 10 µl di soluzione contenente l'iniziatore radicalico ed il progredire della reazione di perossidazione viene monitorato registrando l'assorbanza della soluzione alla lunghezza d'onda di 234 nm per 15 minuti. Quindi vengono addizionati quantità scalari della soluzione a titolo noto di estratto di succo di arance pigmentate fino ad ottenere concentrazioni finali di cianidin-glucoside comprese tra 10^{-7} e 10^{-5} M. Quindi la cinetica di reazione viene seguita spettrofotometricamente per altri 30 minuti. Dalla pendenza della retta ottenuta riportando il valore dell'assorbanza rispetto al tempo, in presenza ed in assenza di inibitore radicalico, è possibile calcolare l'inibizione del processo radicalico che il nostro estratto è in grado di esercitare e conseguentemente il suo potere antiossidante.

La percentuale di inibizione dell'estratto è stata calcolata come percentuale di inibizione dei radicali liberi rispetto al controllo



IL DIRIGENTE SUPERIORE
(Dr. Michele Di Agata)

11

Zappalà Giuseppe
Petrino Giacomo

(ottenuto conducendo la prova solo con l'iniziatore radicalico senza nessun inibitore). I risultati sono riportati qui di seguito:

Conc. estratto (espressa in conc. di antocianine come cianidin-3-glucoside)	% di inibizione della perossidazione
10 ⁻⁷	32
10 ⁻⁶	45
10 ⁻⁵	72

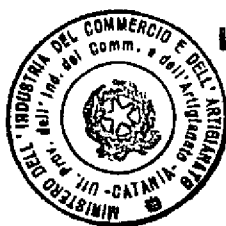
Pertanto come è possibile evidenziare dai risultati ottenuti il nostro estratto è in grado di espletare, a concentrazioni relativamente basse 10⁻⁵, un notevole potere antiossidante in un modello in vitro già utilizzato ampiamente in letteratura per analoghe sperimentazioni.

Valutazione dell'attività "Skin anti-aging" dell'estratto di arance pigmentate.

Gli effetti deleteri della luce ed in particolare delle radiazioni ultraviolette sulla pelle umana sono ben noti e riportati in letteratura. L'esposizioni cronica della pelle alle radiazioni ultraviolette può indurre un'invecchiamento accelerato della pelle noto anche come "photo aging" (Black, H.S.,1987).

E' stato inoltre dimostrato che in questo processo di invecchiamento della pelle i radicali liberi svolgono un ruolo determinate: infatti sostanze ad attività antiossidante, somministrate topicamente, sono in grado di contrastare i danni prodotti alla pelle da un esposizione cronica di essa a radiazioni UV (Bissett et al. 1987).

Uno dei modelli proposti in letteratura (Montenegro et al. 1995) per



IL DIRIGENTE SUPERIORE
(Dr. Michele D'Agata)

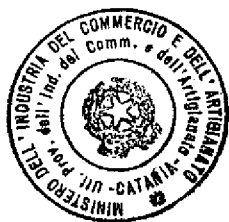
12

Zeppola Giuseppe
Petrino Giacomina

la valutazione in vivo del danno acuto e cronico prodotto dalle radiazioni UV, consiste nel valutare la capacità di una sostanza antiossidante di inibire l'eritema cutaneo indotto da radiazioni UV-B in volontari sani.

Così l'estratto di arance pigmentate, oggetto di questo brevetto, è stato valutato mediante questo modello per verificare l'attività antiossidante di questo e quindi la possibilità di impiego in cosmetica come anti-aging.

La sperimentazione è stata condotta su otto volontari sani inducendo nell'avambraccio di ciascuno di essi un eritema mediante esposizione ad una lampada UV per un opportuno periodo di tempo precedentemente determinato per ciascun soggetto. In ciascun soggetto sono stati provocati, mediante esposizione a radiazioni UV-B, eritemi in zone limitrofe dell'avambraccio ed esattamente su tre aree di 1 cm² ciascuna. Successivamente una delle tre aree è stata trattata con 50 mg di una formulazione costituita da un gel o da una emulsione o/a, le cui composizioni sono descritte nella Tab.2 ed entrambe contenenti una percentuale dell'estratto pari all'1%, mentre la seconda area è stata trattata con la stessa quantità di veicolo priva del principio attivo (estratto) e la terza area è stata utilizzata come controllo. Per la valutazione dell'eritema prodotto è stato utilizzato il metodo del "visual score" che consente una valutazione visiva dell'eritema il cui grado viene espresso dai valori di una scala arbitraria compresa tra + e + + + + +. La valutazione degli eritemi prodotti è stata effettuata dopo 24 ore dall'esposizione alle radiazioni



13
IL DIRIGENTE SUPERIORE
(Dr. Michele D'Agata)

Lepore Giuseppe
Petrino Giacomo

UV-B.

I risultati ottenuti vengono riportati qui di seguito:

Gel contenente l'estratto	0.5%	1%
	++	+
Gel privo di estratto	++++	
Controllo	+++++	
Emulsione o/a contenente l'estratto	0.5%	1%
	+++	++
Emulsione priva di estratto	++++	
Controllo	+++++	

Come è possibile notare dai risultati ottenuti l'estratto di arancie pigmentate è stato in grado di inibire, in entrambe le formulazioni, l'eritema indotto da radiazioni UV-B rispetto agli eritemi trattati con i singoli veicoli privi di estratto ed al controllo.

Pertanto alla luce dei risultati ottenuti noi deduciamo che l'estratto di arancie pigmentate può essere in grado, se introdotto in un veicolo cosmetico, di esercitare un effetto antiossidante quando viene applicato sulla pelle ed è quindi utilizzabile in prodotti ad attività anti-aging.

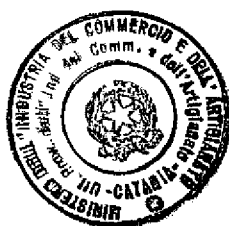
TABELLA 1

CARATTERISTICHE DEL SUCCO

UTILIZZATO PER L'ESTRAZIONE DELLE ANTOCIANINE

°Brix=13,5% Ac. Tot=1,45% Antocianine=250 mg/l(*)

(*) Per la determinazione delle antocianine totali (esprese come cianidina-3-glucoside) vedi Rapisarda P, 1994.



IL DIRIGENTE SUPERIORE
(Dr. Michele D'Agata)

14

Leopoldo Girolamo
Petrino Spiccone

TABELLA 3

Composizione dell'emulsione cosmetica o/a e del gel.

Percento emulsione (p/p)		Percento gel (p/p)	
Estratto idroalcolico	1.00		1.00
di arance pigmentate			
Saccarosio distearato	5.00	Acqua	91.50
Alcoli di lanolina	1.00	Carbopol 940	0.50
Ciclometicone	1.50	Sodio idros. (sol.10%)	1.50
Diottil adipato	9.00	Glicerina	5.00
Alcol cetilico	1.00	EDTA(sale sodico)	0.10
Olio di mand. dolci	3.00	Imidazolidinil urea	0.25
Burro di Karitè	3.50	Fenossietanolo	1.00
Fenossietanolo	0.80	Butilidrossianisolo	0.05
Butilidrossianisolo	0.05		
Gomma Xantan	0.20		
EDTA (sale sodico)	0.20		
Glicerina	4.00		
Acqua dist.	70.50		
Imidazolidinil urea	0.25		



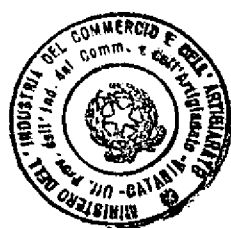
IL DIRIGENTE SUPERIORE
(Dr. Michele D'Agata)

Zappalà Giuseppe

Petrino Giacomina

Bibliografia

- Attaway J. A. in : Medical benefits of juice flavonoids . International Congress of Fruit Juice. Sao Paulo, Brazil; pp.207-219; 1991.
- Black H.S., Photochem.Photobiol. 46, 213-21; 1987.
- Barclay L.R.C., Locke S.J., MacNeil J.M., VanKessel J., Burton G.W., Ingold K.U., J. Am. Chem. Soc., 106 (8); 1984.
- Bissett D.L., Chatterjee R. , Hannon D.P., - - Photodermatol.Photoimmunol.Photobiol. 7, 56-62; 1987.
- Couture R. , Rouseff R., J. Food Science, 57 (2), 380-384; 1992.
- Hernandez E., Couture R., Rouseff R., Chen C.S., Barros S., J. Food Science ,57 (3), 664-670; 1992.
- Kimball D.A., Norman S.I., J. Agric. Food Chem. ,38, 1396-1400; 1990.
- Maccarone E., Maccarrone A., Perrini G., Rapisarda P., Ann. Chim., 73,533; 1983.
- Maccarone E., Maccarrone A., Rapisarda P., Ann. Chim. 75, 79; 1985.
- Mattheus R. F., Rouseff R., Manlan M., Norman S.I., Food Technology, 4 ,130-132; 1990.
- Monsalve A., Powers J.R., Leung H.K., J.Food Sci., 55 (5), 1425-1428; 1990.
- Montenegro L., Bonina F., Rigano L., Giogilli S., Sirigu S., Int. J. Cosm. Sci. 17, 91-103 1995.
- Newmark H.L., in : M.T. Hnang, C.T. Ho and C.Y. Lee (eds)



IL DIRIGENTE SUPERIORE
(Dr. Michele D'Agata)

[Handwritten signature]
16

Leopoldo Gianluce
Petrina Giacomina

Phenolic compounds in Food and their effects on health II. (American Chemical Society, Washington D.C.); pp.48-52 ; 1992.

-Rapisarda P., Fallico B., Izzo R., Maccarone E., *Agrochimica* 38, (1-2), 157-164; 1994.

-Rouseff R., Martin, S.F., Yotsey C.O., *J.Agric. Food Chem.*, 35,1027; 1987.

-Rouseff, R., Seetharaman K., Naim M, Nagy S., Zehavi U., *J. Agric. Food Chem.*, 40, 1139-1143; 1992.

-Tsuda T., Watanabe M., Ohshima K., Norinobu S., Choi S., Kawakishi S., Osawa T., *J. Agric. Food Chem.*, 42, 2407-2410; 1994.

-Wang P.F., Zheng R.L., *Chemistry and Physics of Lipids*, 63, 37-40; 1992.

-Wattenberg L.W., Coccia J.B., Lam L.K.T., *Cancer Res.* 40, 2820-2823 ; 1980.

Catania 03-01-1996

Firma dei richiedenti

Zappalà Gianluca

Zappalà Gianluca

Putrino Giacomina

Putrino Giacomina



IL DIRIGENTE SUPERIORE
(Dr. Michele D'Agata)

[Signature]

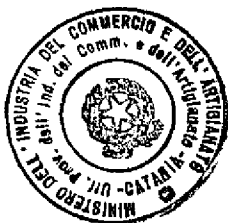
Zappalà Gianluca

Rivendicazioni

1) Procedimento per la produzione di estratti contenenti antocianine, esperidina, narirutina, acidi idrossicinnamici ed acido ascorbico da succhi e da soluzioni acquose provenienti dal lavaggio delle polpe che si originano durante il processo di trasformazione industriale delle arance pigmentate "Moro", "Tarocco" e "Sanguinello".

2) Il Procedimento secondo la rivendicazione 1) comprende i seguenti stadi condotti in successione:

- a) trattamento enzimatico del succo o della soluzione proveniente da pulp wash con enzima pectolitico (Cytrozim L o enzima similare);
- b) filtrazione o decantazione del succo o della soluzione proveniente dal lavaggio delle polpe per separare i solidi sospesi;
- c) passaggio delle soluzioni provenienti dallo stadio "b" su resina polimerica adsorbente a matrice macroporosa stirene-divinilbenzene con porosità compresa tra 30 e 70%, diametro dei pori da 25 a 200A° (Angstrom), area superficiale da 200 a 800 m²/g, non polari o debolmente polari;
- d) lavaggio della resina con acqua o etanolo;
- e) eluizione di antocianine, esperidina, narirutina, acidi idrossicinnamici ed acido ascorbico con alcool etilico (o metilico) contenente dall'1 al 10% di acido citrico o tartarico oppure con una soluzione idroalcolica con concentrazioni di alcool comprese tra il 10 e l'80% sempre acidificate con 1-10% di acido citrico o tartarico;
- f) distillazione sotto vuoto dell'alcool e liofilizzazione o essiccamento a polverizzazione (spray-dryer) dell'estratto acquoso ottenuto;



18

IL DIRIGENTE SUPERIORE
(Dr. Michele D'Agata)

Zappalà Girolamo

Petrino Giacomo

g) purificazione e concentrazione dell'estratto mediante cromatografia su colonna a pressione atmosferica o ad alta pressione utilizzando una resina a fase inversa C18 o polivinilpolipirrolidone o sephadex LH 20.

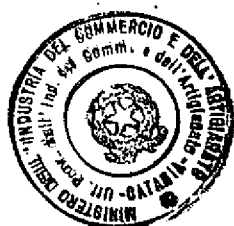
3) Si rivendica l'estratto di arance pigmentate ottenuto come da rivendicazione 1) e 2).

4) Viene rivendicato l'utilizzo delle resine riportate negli esempi ed esattamente Kastel S-112 (Dow Chemical), XAD-16 (Rohm & Haas), Duolite S-861 e resine tecnicamente simili per l'estrazione di antocianine, esperidina, narirutina, acidi caffeico, cumarico, ferulico, sinapico ed ascorbico da succo o soluzioni di lavaggio delle polpe di arance rosse pigmentate (Varietà Moro, Sanguinello e Tarocco) o comunque per la produzione di estratti ottenuti da tali fonti.

5) Sulla base delle prove sperimentali, riportate nella descrizione di questo brevetto, e da noi effettuate e comprovanti l'effetto antiossidante di questi estratti, si rivendica l'utilizzo in campo alimentare (integrazione alimentare).

6) Sulla base delle prove sperimentali, riportate nella descrizione di questo brevetto, e da noi effettuate e comprovanti l'effetto antiossidante di questi estratti, si rivendica l'utilizzo in campo farmaceutico. In particolare si rivendica l'uso dell'estratto, in campo farmaceutico, in tutte le situazioni patologiche e/o fisiopatologiche dove l'assunzione di sostanze antiossidanti può risultare utile sia in fase curativa (come farmaco o integratore alimentare nella dieta) che preventiva.

7) Sulla base delle prove sperimentali, riportate nella descrizione di



19

IL DIRIGENTE SUPERIORE
(Dr. Michele Di A. A. A.)

Zeppolo Giuseppe
Petrino Giacomo

questo brevetto e da noi effettuate e comprovanti l'effetto anti-aging, si rivendica l'utilizzo di tali estratti in campo cosmetico ed in particolare in prodotti anti-aging o comunque utili per la prevenzione dell'invecchiamento cutaneo.

8) Si rivendica altresì l'applicazione nel settore alimentare di qualsiasi prodotto che, utilizzando le attuali conoscenze tecnico-formulative sia possibile ottenere con tali estratti.

9) Si rivendica altresì l'applicazione nel settore farmaceutico di qualsiasi prodotto che, utilizzando le attuali conoscenze tecnico-formulative sia possibile ottenere con tali estratti.

10) Si rivendica altresì l'applicazione nel settore cosmetico di qualsiasi prodotto che, utilizzando le attuali conoscenze tecnico-formulative sia possibile ottenere con tali estratti.

Catania 03-01-1996

Firma dei richiedenti

Zappalà Gianluca

Zappalà Gianluca

Putrino Giacoma

Putrino Giacoma



IL DIRIGENTE SUPERIORE
(Dr. Maria Teresa Agata)