

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
COURBEVOIE

①1 N° de publication : **3 148 148**

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **23 04152**

⑤1 Int Cl⁸ : **A 61 K 8/978 (2023.01), A 61 Q 19/02, 19/08, B 01 D 3/14**

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑫② Date de dépôt : 25.04.23.

⑫③ Priorité :

⑫④ Date de mise à la disposition du public de la demande : 01.11.24 Bulletin 24/44.

⑫⑤ Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑫⑥ Références à d'autres documents nationaux apparentés :

Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : *LABORATOIRES CLARINS société par action simplifiée à associé unique — FR.*

⑦② Inventeur(s) : GORI Anthonin.

⑦③ Titulaire(s) : *LABORATOIRES CLARINS société par action simplifiée à associé unique.*

⑦④ Mandataire(s) : GEVERS & ORES.

⑫④ Procédé d'élimination de la chlorophylle présente dans un extrait végétal et extraits ainsi obtenus.

⑫⑤ La présente invention se rapporte à un procédé d'élimination de la chlorophylle présente dans des extraits végétaux, notamment des extraits végétaux naturels utilisés à des fins cosmétiques et obtenus par extraction alcoolique ; elle se rapporte également aux extraits végétaux à teneur réduite en chlorophylle obtenus par ce procédé.

FR 3 148 148 - A1



Description

Titre de l'invention : Procédé d'élimination de la chlorophylle présente dans un extrait végétal et extraits ainsi obtenus

- [0001] La présente invention se rapporte à un procédé d'élimination de la chlorophylle présente dans des extraits végétaux, notamment des extraits végétaux utilisés à des fins cosmétiques et obtenus par extraction alcoolique ; elle se rapporte également aux extraits végétaux à teneur réduite en chlorophylle obtenus par ce procédé.
- [0002] Les extraits alcooliques, et en particulier éthanoliques, de plante sont généralement les extraits naturels les plus concentrés en métabolites secondaires. Sans traitement ad-ditionnel, ces extraits, lorsqu'ils sont obtenus à partir de parties aériennes, contiennent de la chlorophylle.
- [0003] La chlorophylle est naturellement biosynthétisée dans les plantes et est essentielle à la photosynthèse, elle est également responsable de la couleur verte des extraits obtenus à partir de végétaux. Quel que soit le solvant d'extraction, des traces de chlorophylle sont inévitablement présentes dans les extraits préparés à partir des parties aériennes des plantes (feuilles en particulier).
- [0004] Outre la contribution à la couleur indésirable de l'extrait, la chlorophylle est une molécule photosensibilisatrice, elle peut également agir comme pro-oxydant et avoir ainsi un impact délétère sur l'activité des extraits et donc les formules cosmétiques qui les contiennent (Chotphruethipong *et al.*, *J. Food Biochem.* **41**, 1–10 (2017)). Afin d'améliorer la qualité des extraits végétaux, il est préférable, voire nécessaire, d'en éliminer la chlorophylle, autrement dit, de les traiter par « dé-chlorophyllisation ».
- [0005] La « dé-chlorophyllisation » est généralement réalisée par élimination de la chlorophylle avec du charbon actif, à l'aide de solvants organiques ou encore par sédimentation (Tagrida *et al.*, *J. Food Biochem.* **44**, 1–14 (2020) ; Tagrida, *et al.*, *RSC Adv.* **11**, 17630–17641 (2021); Olatunde *et al.*, *J. Food Biochem.* **42**, 1–11 (2018); Olatunde *et al.*, *Int. J. Food Sci. Technol.* **56**, 2804–2819 (2021)). Cependant les techniques de « dé-chlorophyllisation » au charbon actif et par solvants organiques sont agressives et éliminent, en plus de la chlorophylle, des molécules actives d'intérêt de l'extrait végétal. Pour ce qui est de la technique par sédimentation, elle préserve davantage les molécules actives de l'extrait végétal mais ne permet pas d'éliminer toute la chlorophylle (les rendements décrits dans la littérature sont de 82 % d'après Olatunde *et al.* (2020) et 73 % d'après Tagrida *et al.* (2021)). En outre, cette méthode est longue et coûteuse ; à titre d'illustration, le procédé décrit par Tagrida *et al.* (2020) comprend les étapes de maintien au froid de l'extrait à 4 °C pendant 24 heures, de centrifugation à 10000 g pendant 30 minutes à 4 °C, de collecte du surnageant, de congélation à -20 °C

puis de lyophilisation, son industrialisation nécessite donc des étapes longues et des appareillages coûteux (congélation et lyophilisation).

- [0006] Il demeure donc nécessaire de mettre au point un procédé de dé-chlorophyllisation d'extraits végétaux qui permette une élimination efficace, économique et rapide de la chlorophylle tout en préservant les molécules actives présentes dans l'extrait végétal.
- [0007] C'est ce à quoi est parvenue la Demanderesse avec une nouvelle technique de purification d'extraits végétaux permettant d'éliminer jusqu'à 98 % de la chlorophylle sans perdre les molécules d'intérêt.
- [0008] Plus particulièrement, l'invention se rapporte à un procédé de dé-chlorophyllisation d'un extrait végétal de parties aériennes de plante dans au moins un solvant non aqueux comprenant les étapes suivantes :
- [0009] a) ajustement de la teneur en eau dudit extrait de façon à ce qu'il contienne au moins 3 %, de préférence au moins 10 %, d'eau par rapport au volume total de solvant de l'extrait;
- [0010] b) évaporation du au moins un solvant non aqueux contenu dans le mélange obtenu à l'issue de l'étape a) sans évaporation de l'eau ; et
- [0011] c) filtration à un seuil de coupure d'au plus environ 50 µm et élimination des résidus.
- [0012] Les parties aériennes de plante comprennent classiquement les feuilles, les tiges et les parties aériennes fleuries. De préférence, la partie aérienne de plante est constituée des feuilles.
- [0013] Le procédé selon l'invention peut s'appliquer à tout extrait végétal de parties aériennes de plante dans au moins un solvant non aqueux, en particulier, il peut être obtenu en mélangeant tout extrait sec végétale de parties aériennes de plantes dans au moins un solvant non aqueux. Alternativement, il peut être obtenu par extraction avec au moins un solvant non aqueux ; selon ce mode de réalisation et à titre d'exemple et sans caractère limitatif, l'extrait peut être obtenu par macération, reflux, ultrason, microonde... par exemple, par extraction à reflux avec au moins un solvant non aqueux à partir de parties aériennes séchées de plante, de préférence broyées ; et filtration ou essorage pour éliminer les résidus solides.
- [0014] Le solvant non aqueux est un solvant organique ayant un point d'ébullition inférieur à celui de l'eau, il peut être en particulier choisi parmi l'éthanol, l'acétate d'éthyle.
- [0015] L'eau ajoutée à l'extrait végétal (liquide ou solubilisé dans au moins un solvant non aqueux tel qu'un solvant organique) à l'étape a) est introduite de telle sorte que sa quantité soit d'au moins 3 % v/v, de préférence au moins 10 % v/v, d'eau (volume d'eau par rapport au volume total solvant non aqueux et eau) ; il n'y a pas de limite supérieure à la quantité d'eau ajoutée, ainsi, des quantités plus importantes d'eau peuvent être ajoutées mais on préfère éviter des quantités trop importantes qui nécessiteront une élimination ultérieure de l'eau.

- [0016] L'étape b) peut être conduite selon les techniques classiques connues de l'homme du métier ; selon un mode de réalisation particulier, elle est conduite selon les modalités suivantes : l'évaporation du solvant non aqueux contenu dans le mélange issu de l'étape a) est réalisée sous vide avec un appareil type Rotavapor®, permettant d'évaporer des solvant sous leurs points d'ébullition en utilisant le vide. L'extrait est chauffé entre 20 et 60 °C de préférence à 40 °C ; le vide utilisé est compris entre 10 et 200 mbars de préférence à 72 mbars.
- [0017] L'étape c) est de préférence conduite avec une membrane de filtration du type fibre cellulosique ayant un seuil de coupure compris entre 0,2 et 50 µm, de préférence inférieur à 10 µm, encore préférentiellement d'environ 1 µm.
- [0018] A l'issue du procédé selon l'invention, l'extrait végétal décoloré peut être encore traité par des étapes classiques dans le but de le standardiser, de le stériliser ou encore de le stabiliser, par exemple en changeant le solvant final qui est de l'eau, et donc non bactériostatique, par un solvant glycolé.
- [0019] Le procédé selon l'invention se distingue donc de celui de sédimentation notamment en ce qu'il ne nécessite pas d'évaporer le solvant d'extraction avant l'ajout d'eau.
- [0020] Outre son très bon rendement (élimination totale de la chlorophylle et conservation de matière active des extraits végétaux), le procédé selon l'invention présente l'avantage :
- [0021] - d'être rapide, il peut être mis en œuvre en approximativement 1 à 6 heures, en ce qu'il comporte moins d'étape que le procédé de dé-chlorophyllisation par sédimentation (pas d'étape de refroidissement, de centrifugation et de lyophilisation) ;
- [0022] - de pouvoir être mis en œuvre avec des appareillages industriels simples et peu coûteux ;
- [0023] - d'être moins coûteux qu'une décoloration au charbon car il ne nécessite pas d'ajouter un intrant mis à part de l'eau.
- [0024] La présente invention se rapporte encore à un extrait végétal de parties aériennes de plante susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'invention et caractérisé en ce qu'il contient moins de 0,05 mg/ml, de préférence moins de 0,04 mg/ml et encore préférentiellement de moins de 0,03 mg/ml de chlorophylle (correspondant respectivement à des pourcentages de 0,005 % p/v, 0,004 % p/v et 0,003 % p/v).
- [0025] La présente invention se rapporte plus particulièrement à un extrait végétal de parties aériennes, de préférence les feuilles, de *Combretum micranthum* purifié et décoloré selon le procédé selon l'invention et caractérisé en ce qu'il contient moins de 0,05 mg/ml, de préférence moins de 0,04 mg/ml et encore préférentiellement de moins de 0,03 mg/ml de chlorophylle.
- [0026] *Combretum micranthum* (kinkéliba) est une plante de la famille des Combretaceae. Elle est aussi désignée : *Bureava crotonoides* ; *Combretum altum* ; *Combretum flo-*

ribundum ; *Combretum parviflorum* ; *Combretum raimbaultii* ; ou encore kinkeliba (nom vernaculaire). C'est une plante commune d'Afrique que l'on retrouve généralement dans les pays du Sahel.

[0027] Avantageusement et malgré le traitement de dé-chlorophyllisation, cet extrait est riche en molécules actives, il contient en particulier entre 5 et 25 %, de préférence entre 9 et 19%, encore préférentiellement au moins 14 % de kinkéloïdes dans l'extrait sec ; celui-ci peut également contenir des flavonoïdes.

[0028] De tels extraits de *C. micranthum* peuvent être utilisés à des fins cosmétiques comme dépigmentant, anti-tâche, blanchissant, anti-rougeur et uniformisateur de teint ou encore pour des activités anti-âge, pour prévenir et/ou traiter le relâchement cutané, la perte de fermeté cutanée, la perte d'élasticité des fibres cutanées, une peau flétrie, une peau amincie, les rides et ridules et une peau terne et/ou sans éclat.

Figures

[0029] [Fig.1] représente un diagramme d'un exemple de procédé de préparation d'un extrait végétal comprenant des étapes d'extraction préalables, les étapes du procédé selon l'invention (indiquées par les lettres a), b) et c)) ainsi que des étapes postérieures au procédé selon l'invention.

[0030] [Fig.2] représente les chromatogrammes UV 280 de l'extrait brut 1 avant traitement en haut et de l'extrait traité 1 en bas. La barre grisée de gauche représente le pic de chlorophylle B et celle de droite, celui de chlorophylle A.

[0031] [Fig.3] représente les chromatogrammes ELSD de l'extrait brut 1 avant traitement en haut et de l'extrait traité 1 en bas.

Exemples

Préparation d'extraits selon l'invention

[0032] Extraction : 300 g de feuilles de *Combretum micranthum* préalablement broyées sont traitées dans 2917 g d'éthanol à reflux pendant 3 h dans un ballon de 5 L. Au bout des 3 h d'extraction, le mélange est filtré à 40 µm sur un filtre à pression type « Beco Integra Lab 140 P » de la marque Eaton. Cette filtration permet de récupérer 1915 g d'extrait dans l'éthanol, la plante est récupérée afin de faire une nouvelle extraction à reflux avec 2820 g d'éthanol pendant 3 h dans un ballon de 5 L. Au bout des 3 h le mélange est de nouveau filtré à 40 µm. Cette fois-ci les drêches sont éliminées. Cette deuxième extraction permet de récupérer 2744 g d'extrait dans l'éthanol.

[0033] Au total, 4659 g d'extrait brut sont récupérés à cette étape.

Mise en œuvre du procédé selon l'invention :

[0034] A cette étape, 10 % d'eau sont ajoutés au total d'extrait brut, soit 465 g d'eau ajoutée.

[0035] Le solvant organique (éthanol) est ensuite évaporé sur un système d'évaporation sous

vide de type « Rotavapor R-300 » de la marque Buchi. L'éthanol est évaporé à 40°C et à 100 mbar. Il faut faire cependant attention à ne pas évaporer l'eau ajoutée.

[0036] Le mélange est ensuite filtré à 1 µm.

[0037] A la suite de cette filtration, l'extrait traité, c'est-à-dire décoloré et purifié de *Combretum micranthum* est obtenu.

Analyse de plusieurs extraits végétaux

[0038] Afin d'évaluer le rendement du procédé selon l'invention, le dosage des chlorophylles A et B (selon Olatunde *et al.*, 2018 et AOAC (2002) Official Method of Analysis) a été réalisé sur différents extraits :

[0039] - ceux préparés comme décrits ci-dessus sans traitement pour éliminer la chlorophylle (extrait brut) ; et

[0040] - ceux préparés comme décrits ci-dessus avec traitement pour éliminer la chlorophylle (extrait traité).

[0041] [Tableaux1]

Échantillons	Chlorophylle A (mg/ml)	Chlorophylle B (mg/ml)	Total Chlorophylle (mg/ml)	Réduction de la chlorophylle totale par rapport au brut
Extrait Brut 1	1.02	0.72	1.74	
Extrait Traité 1	0.01	0.03	0.04	43.5
Extrait Brut 2	0.99	0.75	1.74	
Extrait Traité 2	0.02	0.03	0.05	34.8
Extrait Brut 3	1.05	0.68	1.73	
Extrait Traité 3	0.01	0.02	0.03	57.7

[0042] *Tableau 1 : Tableau du dosage des chlorophylles dans 3 extraits de la même plante*

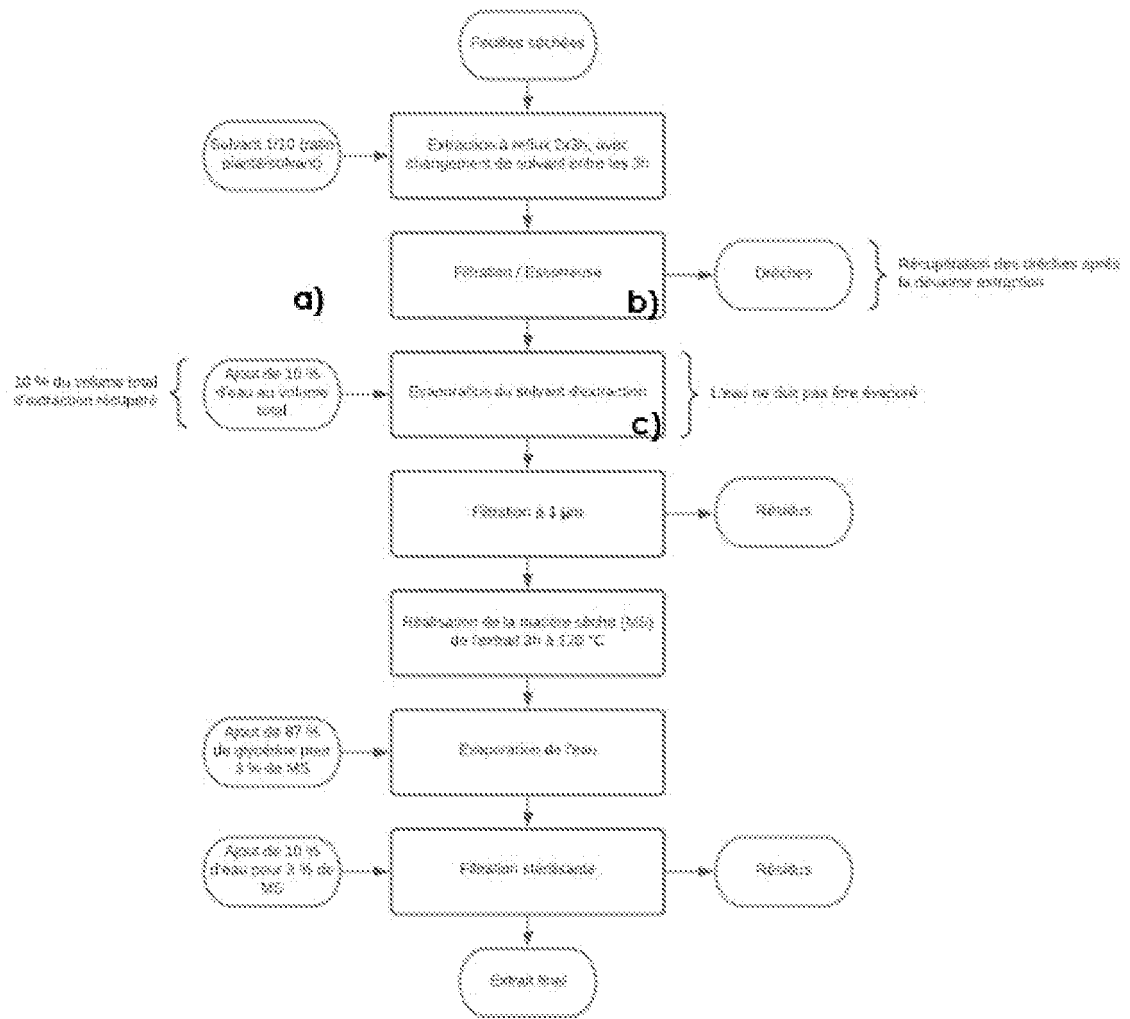
[0043] Ces résultats montrent un excellent rendement d'élimination des chlorophylles A et B par le procédé selon l'invention ; ces rendements sont bien supérieurs à ceux décrits dans la littérature.

[0044] En complément, les profils chromatographiques des extraits bruts et traités ont été comparés pour s'assurer que la perte de matière active est réduite ; les chromatogrammes des figures 2 et 3 confirment l'élimination de la chlorophylle (pics de droite) et la conservation des molécules d'intérêt (pics de gauches).

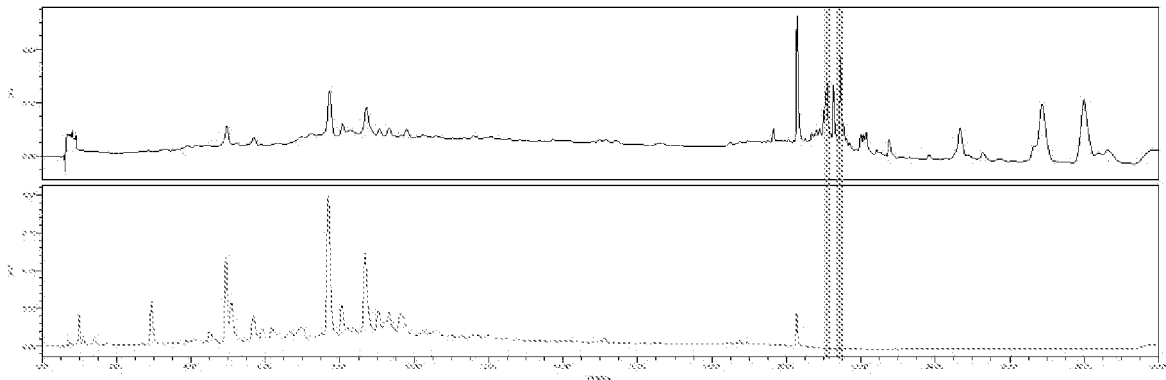
Revendications

- [Revendication 1] Procédé de dé-chlorophyllisation d'un extrait végétal de parties aériennes de plante obtenu par extraction avec au moins un solvant non aqueux comprenant les étapes suivantes :
- a) ajustement de la teneur en eau dudit extrait de façon à ce qu'il contienne au moins 3 %, de préférence au moins 10 %, d'eau par rapport au volume total de solvant contenu dans l'extrait;
 - b) évaporation du au moins un solvant non aqueux contenu dans le mélange obtenu à l'issue de l'étape a) sans évaporation de l'eau ;
 - c) filtration à un seuil de coupure d'au plus environ 50 µm et élimination des résidus.
- [Revendication 2] Procédé de dé-chlorophyllisation selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'étape b) est réalisée par évaporation sous vide avec un chauffage du mélange obtenu à l'issue de l'étape a) à une température comprise entre 20 et 60 °C et avec un vide compris entre 10 et 200 mbars.
- [Revendication 3] 3. Procédé de dé-chlorophyllisation selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que la filtration de l'étape c) est réalisée à un seuil de coupure inférieur à 10 µm.
- [Revendication 4] Extrait végétal de parties aériennes de plante obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il contient moins de 0,05 mg/ml de chlorophylle.
- [Revendication 5] Extrait végétal de parties aériennes de *Combretum micranthum* susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il contient moins de 0,05 mg/ml de chlorophylle.
- [Revendication 6] Extrait végétal de parties aériennes de *Combretum micranthum* selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il contient entre 5 et 25 %, de préférence entre 9 et 19%, encore préférentiellement au moins 14 % de kinkéloïdes dans l'extrait sec.
- [Revendication 7] Utilisation cosmétique d'un extrait végétal de parties aériennes de *Combretum micranthum* selon la revendication 5 ou la revendication 6, comme dépigmentant, anti-tâche, blanchissant, anti-rougeur et uniformisateur de teint ou encore pour des activités anti-âge, pour prévenir et/ou traiter le relâchement cutané, la perte de fermeté cutanée, la perte d'élasticité des fibres cutanées, une peau flétrie, une peau amincie, les rides et ridules et une peau terne et/ou sans éclat.

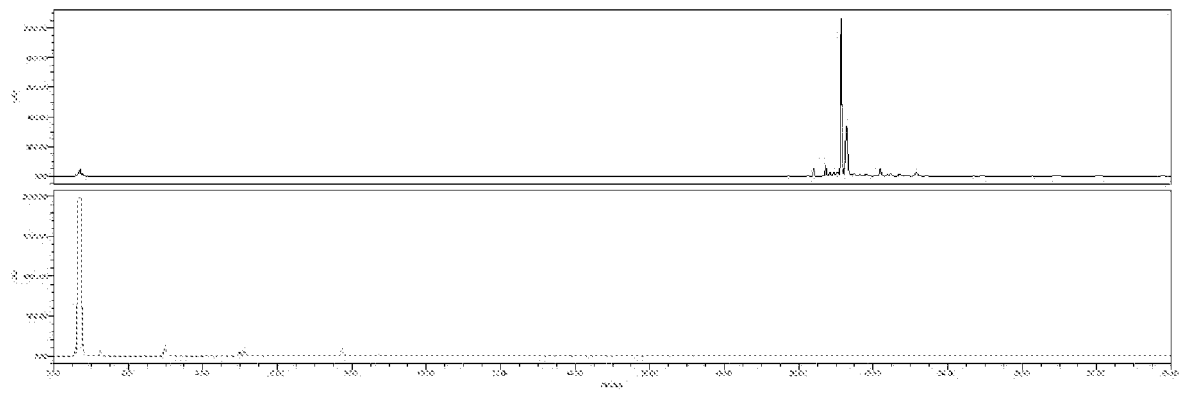
[Fig. 1]



[Fig. 2]



[Fig. 3]



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 920066
FR 2304152

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	DATABASE WPI Week 201135 Thomson Scientific, London, GB; AN 2011-F22569 XP002810723, & CN 101 999 494 A (NANTONG MAITE BIO-ENG CO LTD) 6 avril 2011 (2011-04-06)	1-4	A61K 8/9789 A61Q 19/02 A61Q 19/08 B01D 3/14
Y	* abrégé * -----	5-7	
X	CN 101 979 632 A (NANTONG MT BIOENGINEERING CO LTD) 23 février 2011 (2011-02-23)	1-4	
Y	* revendication 1 * -----	5-7	
X	KR 2016 0075419 A (BAE YONG TAE [KR]) 29 juin 2016 (2016-06-29)	4	
Y	* alinéa [0012]; revendications 1-5;	5	
A	exemples 1-3 * -----	1-3, 6, 7	
X	US 2013/143921 A1 (SIMON JAMES E [US] ET AL) 6 juin 2013 (2013-06-06)	4-6	
A	* le document en entier * -----	1-3, 7	
X	US 2022/040083 A1 (HU SHUTING [CN] ET AL) 10 février 2022 (2022-02-10)	4-7	
A	* revendications 13-31 * -----	1-3	
	-/--		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
15 décembre 2023		Szarek, Sophie	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention	
X : particulièrement pertinent à lui seul		E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure	
Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un		à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date	
autre document de la même catégorie		de dépôt ou qu'à une date postérieure.	
A : arrière-plan technologique		D : cité dans la demande	
O : divulgation non-écrite		L : cité pour d'autres raisons	
P : document intercalaire		
		& : membre de la même famille, document correspondant	

**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 920066
FR 2304152

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	"Utilisation cosmétique d'extrait de Combretum micranthum", RESEARCH DISCLOSURE, KENNETH MASON PUBLICATIONS, HAMPSHIRE, UK, GB , vol. 703, no. 2 1 septembre 2022 (2022-09-01), XP007150654, ISSN: 0374-4353 Extrait de l'Internet: URL:https://www.researchdisclosure.com/dat abase/RD703002 [extrait le 2022-09-26]	4-7	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
A	* page 2 - page 3 * -----	1-3	
X	DATABASE GNPD [Online] MINTEL; 12 septembre 2022 (2022-09-12), anonymous: "Protective Shower Gel", XP093112421, Database accession no. 9779690	4-7	
A	* le document en entier * -----	1-3	
X	DATABASE GNPD [Online] MINTEL; 28 mai 2014 (2014-05-28), anonymous: "Eye Contour Serum", XP093112422, Database accession no. 2356997	4-7	
A	* le document en entier * -----	1-3	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
15 décembre 2023		Szarek, Sophie	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 2304152 FA 920066**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **15-12-2023**
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
CN 101999494 A	06-04-2011	AUCUN	

CN 101979632 A	23-02-2011	AUCUN	

KR 20160075419 A	29-06-2016	AUCUN	

US 2013143921 A1	06-06-2013	CA 2798509 A1	10-11-2011
		EP 2566326 A1	13-03-2013
		US 2013143921 A1	06-06-2013
		WO 2011140066 A1	10-11-2011

US 2022040083 A1	10-02-2022	CN 110882189 A	17-03-2020
		CN 112770722 A	07-05-2021
		EP 3851095 A1	21-07-2021
		US 2022040083 A1	10-02-2022
		WO 2020052571 A1	19-03-2020
