



**MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO**  
**DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE**  
**UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI**

<b>DOMANDA NUMERO</b>	<b>102006901409766</b>
<b>Data Deposito</b>	<b>28/04/2006</b>
<b>Data Pubblicazione</b>	<b>28/10/2007</b>

<b>Sezione</b>	<b>Classe</b>	<b>Sottoclasse</b>	<b>Gruppo</b>	<b>Sottogruppo</b>
A	61	K		

Titolo

METODO PER LA PREPARAZIONE E L' USO DI UN ESTRATTO ARRICCHITO IN CIANIDINA- 3- O BETA- GLUCOPIRANOSIDE E SUOI DERIVATI DA FRUTTI E VEGETALI CONTENENTI DETTA ANTOCIANINA E PER LA PURIFICAZIONE E L USO DI CIANIDINA- 3- O- BETA- GLUCOPIRANOSIDE E SUOI DERIVATI DA TALE ESTRATTO

DESCRIZIONE

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione avente per titolo:

"Metodo per la preparazione e l'uso di un estratto arricchito in cianidina-3-O- $\beta$ -glucopiranoside e suoi derivati da frutti e vegetali contenenti detta antocianina, e per la purificazione e l'uso di cianidina-3-O- $\beta$ -glucopiranoside e suoi derivati da tale estratto"

a nome: Giuseppe LAZZARINO 20%, Barbara TAVAZZI 20%, Fabrizio LORENZI 20%, Angela Maria AMORINI 15%, Bruno GIARDINA 15%, Valentina DI PIETRO 10%

Inventori: Giuseppe LAZZARINO, Barbara TAVAZZI, Fabrizio LORENZI, Angela Maria AMORINI, Bruno GIARDINA, Valentina DI PIETRO

\* \* \*

La presente invenzione concerne un metodo per la preparazione e l'uso di un estratto arricchito in cianidina-3-O- $\beta$ -glucopiranoside e suoi derivati da frutti e vegetali contenenti detta antocianina, e per la purificazione e l'uso di cianidina-3-O- $\beta$ -glucopiranoside e suoi derivati da tale estratto. In particolare, il metodo secondo l'invenzione consente la preparazione di un estratto arricchito in cianidina-3-O- $\beta$ -glucopiranoside e del suo derivato

BARZANO & ZANARDO ROMA SpA

cianidina-3-O- $\beta$ -glucopiranoside malonilata, esente da sostanze tossiche, da utilizzare vantaggiosamente come integratore alimentare e la purificazione di cianidina-3-O- $\beta$ -glucopiranoside e del suo derivato cianidina-3-O- $\beta$ -glucopiranoside malonilata con un grado di purezza tale da consentire la preparazione di formulazioni farmaceutiche.

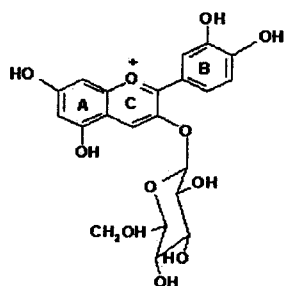
Le antocianine sono un'intera famiglia di pigmenti in cui una molecola di antociano è legata ad una molecola di carboidrato; il residuo saccaridico rende queste sostanze altamente solubili in acqua. Gli antociani danno il colore a molti fiori e frutti; infatti, sono dovute ad antociani le sfumature di rosso che vanno verso il porpora (presenti ad esempio nelle mele, ciliegie, pesche, uva, radicchio rosso, ravanelli), mentre il rosso che sfuma verso l'arancione (come nel pomodoro, peperoni, ecc.) è dovuto in gran parte alla presenza di carotenoidi localizzati nei plastidi. Nel regno vegetale, il ruolo biologico principale delle antocianine è quello di attrarre gli animali per il processo di impollinazione e successiva dispersione dei semi. Come accennato, le antocianine sono diffuse in differente concentrazione anche in numerosi frutti; in particolare, esse sono le maggiori responsabili

del colore presente nelle arance rosse di Sicilia, che rappresentano circa il 70% dell'intera produzione nazionale di arance.

Da un punto di vista strutturale, le antocianine sono caratterizzate dall'avere la struttura cationica di base del sale di flavilio, con differenti sostituenti sull'anello B. La deficienza elettronica della loro struttura, rende le antocianine altamente reattive e la loro stabilità dipende dal pH e dalla temperatura (1). Il residuo saccaridico delle antocianine può essere legato al carbonio 3, 5, 7, 3', 5', ed i monosaccaridi più comuni sono il glucosio, il ramnosio, il galattosio, lo xilulosio e l'arabinosio. L'antocianina privata della sua componente saccaridica viene detta aglicone. Va sottolineato che, a causa della presenza simultanea nella molecola di numerosi gruppi OH, le antocianine sono anche considerate da un punto di vista chimico dei polifenoli. Tra le differenti antocianine, il nostro interesse si focalizza sulla cianidina-3-O- $\beta$ -glucopiranoside (C-3-G) che è un'antocianina distribuita in diversi frutti e vegetali, come ad esempio, fragola, mirtillo, mora, ciliegia, rabarbaro, rapa rossa, cipolla rossa, gelsi neri ecc. (2, 3) così come nelle arance rosse (delle

qualità denominate Moro, Sanguinello e Tarocco) (4) che crescono prevalentemente in Sicilia ed in piccola parte anche nell'isola Malta. Nelle arance rosse delle qualità su indicate, la C-3-G rappresenta circa il 90% del contenuto totale di antocianine, raggiungendo una abbondanza relativa decisamente rimarchevole (fino a 500-600 mg/l di succo). A tale proposito, va purtroppo sottolineato che l'arancia rossa risulta come un frutto talmente poco valorizzato da portare alla distruzione di circa il 50% del raccolto totale, nonostante che la composizione chimica renda questa varietà di arance assolutamente peculiare da un punto di vista nutrizionale.

Come indicato sotto, la formula della C-3-G ha due gruppi OH nelle posizioni 3'- e 4'- dell'anello B (per un totale di 4 gruppi ossidrilici per ciascuna molecola di C-3-G) ed un residuo di  $\beta$ -D-glucosio in forma piranosica legato all'anello C per mezzo di un legame 3-O- $\beta$ -glicosidico.



Negli ultimi anni, è stata rivolta grande attenzione alla possibile protezione esercitata dagli antiossidanti naturali presenti nella dieta vegetale verso i danni cellulari e tissutali provocati dall'azione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (5, 6), con particolare considerazione agli effetti dei flavonoidi e dei polifenoli (7-9). Inoltre, anche se alcuni dubbi sono sorti a causa della loro instabilità a pH fisiologico, i dati ottenuti da recenti ricerche sperimentali hanno iniziato a far considerare le antocianine come sostanze naturali con funzioni protettive di grande rilievo (1, 10). Infatti, si ritiene che le antocianine abbiano una spiccata attività "scavenger" nei confronti dei radicali liberi dell'ossigeno, perfino molto superiore a quella di altri antiossidanti naturali.

La potenza antiossidante delle antocianine

sembrerebbe essere dipendente dalla loro struttura chimica, anche se il meccanismo d'azione e le relazioni tra struttura e funzione delle differenti antocianine non è stato completamente compreso. Infatti, è stato riportato che, variando sia la posizione che il tipo dei gruppi chimici legati agli anelli aromatici delle antocianine, è possibile modulare la loro capacità di accettare elettroni spaiati dalle molecole radicaliche e, di conseguenza, di incrementare o diminuire la corrispondente attività antiossidante (1, 10). La sostituzione O-difenolica nell'anello B delle antocianine ed il sistema a doppi legami coniugati sono correlati alle loro attività di eliminazione di radicali dovuta alla cessione dell'H<sup>•</sup> e susseguente stabilizzazione radicalica. In altri casi, la presenza di gruppi ossidrili addizionali non aumenta, però, la proprietà antiossidante delle antocianine, valutata in vitro sulla perossidazione delle LDL umane. Tali dati difficilmente interpretabili non hanno ancora permesso, come già detto, di trovare una definitiva correlazione tra struttura e funzione delle antocianine (1, 11). Tra le differenti antocianine, la C-3-G è stata indicata come una di quelle dotate di maggiore capacità antiossidante (1, 10, 12-15); il

suo meccanismo di azione, almeno per quanto riguarda i sistemi di generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) metallo-dipendenti, è stato in gran parte attribuito alla sua capacità di complessare ioni metallici divalenti necessari per generare ROS attraverso la reazione di Fenton (1). Il meccanismo prevede che la C-3-G formi il complesso con i metalli attraverso la ionizzazione dei gruppi ossidrilici dell'anello B che però, a pH 7.4, potrebbe avvenire in minima percentuale a causa del carattere debolmente acido dei fenoli. Recentemente, è stata ottenuta una migliore caratterizzazione del profilo antiossidante e del meccanismo d'azione della C-3-G, come ad esempio la sua interazione con il radicale idrossile, gli anioni superossido e l'acqua ossigenata, ed il valore del suo potenziale redox (16). Studi successivi, condotti sempre dal nostro gruppo di ricerca, hanno anche messo in evidenza la proprietà della C-3-G di ridurre i danni indotti da ischemia e riperfusione nel cuore isolato di ratto e il danno perossidativo indotto da acqua ossigenata in eritrociti umani isolati (17, 18). Inoltre, abbiamo anche messo in evidenza un nuovo effetto della C-3-G collegato alla sua capacità differenziante in cellule tumorali di melanoma umano in cui la molecola è stata



in grado, attraverso un meccanismo di attivazione genica di specifici geni responsabili del differenziamento cellulare, che può senza dubbio prospettare nuove possibili applicazioni farmacologiche e nutrizionali della C-3-G (19).

Ad oggi, non esiste un procedimento che, a partire da fonti a bassissimo costo quali ad esempio il succo di arance rosse di Sicilia (o fonti naturali simili ma a maggior costo e resa superiore quali il succo di gelsi neri, il succo di cocomero, il succo di ciliegie nere, ecc.) permetta di ottenere la C-3-G a un grado di purezza tale da consentire preparati per formulazioni farmaceutiche.

Ad oggi, i procedimenti esistenti non permettono di ottenere, ad uno stadio intermedio del processo di purificazione, un preparato liofilizzato contenente C-3-G e vitamina C in concentrazioni tali da poter essere utilizzato come integratore alimentare.

L'unico preparato liofilizzato ottenuto a partire dal succo di arance rosse a base di C-3-G, prevede l'uso di metodi più complessi e che non garantiscono di ottenere un prodotto finito privo di qualsiasi contaminazione dovuta al contatto con sostanze potenzialmente dannose per la salute umana.

Gli estratti contenenti C-3-G ottenuti da fonti diverse dal succo di arance rosse (come ad esempio il mirtillo) e attualmente in commercio contengono al loro interno differenti specie di antocianine che sono, a loro volta, dotate di efficacia antiossidante, differente da antocianina ad antocianina.

Alla luce di quanto sopra esposto risulta pertanto evidente l'esigenza di poter disporre di un metodo di estrazione della cianidina-3-O- $\beta$ -glucopiranoside e dei suoi derivati che superi gli svantaggi della tecnica nota.

Sulla base dei presupposti scientifici legati alle proprietà biologiche della C-3-G, gli autori della presente invenzione hanno messo a punto in laboratorio un metodo semplice, a basso costo ed elevata resa per la estrazione e purificazione della C-3-G dal succo di arance rosse di Sicilia, metodo che può essere applicato a qualunque estratto di origine naturale contenente quantità significative (da un punto di vista industriale) di C-3-G e del suo derivato malonilato. Il metodo, oggetto della presente invenzione può essere applicato per ottenere un preparato a base di C-3-G ad elevatissimo grado di purezza (circa il 99%) da utilizzare per la

preparazione di formulazioni farmaceutiche a base di C-3-G, oppure può essere applicato per la preparazione di un prodotto liofilizzato da utilizzare come integratore alimentare a base di C-3-G, del suo derivato malonilato e di vitamina C (acido ascorbico).

Il succo di arance rosse di Sicilia rappresenta la fonte elettiva per l'estrazione e purificazione della C-3-G sia perché la molecola rappresenta il 90% del suo contenuto totale in antociani, sia perché il costo del succo di arance rosse ha un costo molto minore e un'abbondanza molto maggiore rispetto ad altre possibili fonti naturali.

Il metodo oggetto della presente invenzione permette di decidere il livello di estrazione e purificazione della C-3-G in base alle esigenze produttive legate al mercato e, per la prima volta, consente la produzione di un preparato da utilizzare come integratore alimentare costituito dalla contemporanea presenza di C-3-G, del suo derivato malonilato e di acido ascorbico che esplicano un effetto sinergico esaltando reciprocamente le rispettive proprietà antiossidanti.

Inoltre, l'invenzione concerne un metodo di produzione industriale totalmente esente da

manipolazione del succo di arance rosse con sostanze organiche, per lo meno fino al livello di preparazione del liofilizzato utilizzabile come integratore alimentare. I successivi passaggi di purificazione per ottenere una preparazione a base di C-3-G utilizzabile per formulazioni farmaceutiche prevedono l'uso di sostanze organiche facilmente e totalmente rimuovibili (metanolo e acido formico), sostanze peraltro largamente utilizzate nell'industria farmaceutica sia per processi di sintesi che per procedure di purificazione.

Infine, il metodo oggetto della presente invenzione garantisce di ottenere un preparato da usare come integratore costituito da una sola antocianina, la cianidina, nelle sue forme glicosilata (C-3-G) e contemporaneamente glicosilata e malonilata (C-3-G malonilata), mentre al più alto grado di purezza si ottengono preparazioni monocomponenti costituite solo da C-3-G o da C-3-G malonilata (la scelta del mix C-3-G + C-3-G malonilata, logicamente basata sull'eguale potenza antiossidante dei due composti, dipende da scelte di tipo industriale e/o burocratico).

Forma pertanto oggetto specifico della presente invenzione un metodo per la preparazione di un

estratto arricchito di cianidina-3-O- $\beta$ -glucopiranoside e suoi derivati da frutti, come ad esempio arance rosse, fragola, mirtillo, mora, ciliegia, gelso nero, lampone, cocomero, uva nera, uva fragola o vegetali, come ad esempio rabarbaro, rapa rossa, cipolla rossa, riso rosso contenenti detto composto, comprendente le seguenti fasi:

- a) raccolta del succo dai frutti o vegetali, ad esempio mediante spremitura, e rimozione dell'eventuale presenza di particolato, ad esempio mediante centrifugazione o semplice filtrazione attraverso un setto filtrante di materiale inerte quali, ad esempio, vetro poroso, garze filtranti, carta filtrante;
- b) filtrazione del liquido ottenuto nella fase a) mediante osmosi inversa oppure mediante ultrafiltrazione/nanofiltrazione che impiegano una membrana, ad esempio polimerica o di ceramica, con un taglio molecolare di filtrazione per soluti non carichi di 100-800 Da, preferibilmente 200-500 Da, ancora più preferibilmente 300 Da; e
- c) raccolta del filtrato.

Il metodo secondo l'invenzione può comprendere ulteriormente la fase d) di liofilizzazione del filtrato. Inoltre, il metodo può comprendere una

ulteriore fase e) di purificazione della C-3-G, successiva alla fase c) o alternativa ad essa, che può essere effettuata in continuo al termine della fase di filtrazione b).

Per quanto riguarda la fase b) di filtrazione, il polimero della membrana polimerica per l'osmosi inversa è scelto dal gruppo che consiste in acetato di cellulosa, poliammide, polieteresulfone, mentre la membrana polimerica per l'osmosi inversa è scelta nel gruppo che consiste in membrana a flusso tangenziale a spirale avvolta, membrana a fibre cave. Le membrane per l'ultrafiltrazione/nanofiltrazione sono costituite da membrane ceramiche. La filtrazione può essere condotta ad una pressione da 5 a 40 bar, preferibilmente da 15 a 35 bar, ancora più preferibilmente a 27 bar e permeabilità da 3 a 23 litri/ore  $m^2$ , preferibilmente da 8 a 18 litri/ore  $m^2$ , ancora più preferibilmente da 10 a 14 litri/ore  $m^2$ .

La fase d) di liofilizzazione del filtrato può essere condotta a una temperatura da  $-100$  a  $-60^{\circ}C$ , preferibilmente  $-80^{\circ}C$  e ad una pressione da  $0,01 \times 10^{-3}$  mbar a  $10 \times 10^{-3}$  mbar, preferibilmente da  $0,1 \times 10^{-3}$  mbar a  $5 \times 10^{-3}$  mbar, ancora più preferibilmente  $1 \times 10^{-3}$  mbar.

La fase e) di purificazione della C-3-G può essere condotta mediante cromatografia HPLC in fase inversa ad esempio mediante l'impiego di una colonna ODS C-18 con particelle da 5  $\mu$ m, lunghezza 250 mm e diametro interno di 4,6 mm.

La HPLC può essere effettuata utilizzando un gradiente a salti mediante l'impiego di due eluenti, rispettivamente, eluente A contenente un acido organico volatile in concentrazione compresa tra 25 e 250 ml/l, preferibilmente tra 50 e 200 ml/l, ancora più preferibilmente 100 ml/l e acqua a complemento del volume di un litro (rispettivamente, tra 975 e 750 ml/, più preferibilmente tra 950 e 800 ml/l, ancora più preferibilmente 900 ml/l) ed eluente B contenente un acido organico volatile in concentrazione compresa tra 10 e 100 ml/l, preferibilmente tra 25 e 75 ml/l, ancora più preferibilmente 50 ml/l, un alcool primario, secondario o terziario in concentrazione compresa tra 300 e 800 ml/l, preferibilmente tra 400 e 700 ml/l, ancora più preferibilmente 500 ml/l, e acqua a complemento del volume di un litro, il gradiente a salti essendo ottenuto nel seguente modo: eluizione isocratica con il 100% di eluente A della durata minima di 1 minuto e massima di 15 minuti; da 0,5 a 5

minuti fino a raggiungere una percentuale di tampone A compresa tra 95% e 80%; da 5 a 50 minuti fino a raggiungere una percentuale di tampone A compresa tra 50% e 0%. Il flusso della corsa cromatografica è mantenuto costante ad una velocità compresa tra 0,8 e 1,8 ml/min, preferibilmente ad una velocità compresa tra 1,0 e 1,5 ml/min, ancora più preferibilmente ad una velocità di 1,2 ml/min. La temperatura è anch'essa mantenuta costante a valori compresi tra 0 e 30 °C, preferibilmente tra 8 e 25 °C, ancora più preferibilmente a 23 °C. L'acido organico volatile può essere scelto nel gruppo che consiste in acido formico, malonico, ossalico, succinico, trifluoroacetico, tricloroacetico, acetico, mentre l'alcool può essere scelto nel gruppo che consiste in metanolo, etanolo, n-butanolo, alcool sec-butilico, alcool tert-butilico, propanolo, isopropanolo. La rivelazione spettrofotometrica può essere condotta mediante un rivelatore UV-visibile a serie di diodi selezionato per l'acquisizione delle corse cromatografiche tra 200 e 600 nm di lunghezza d'onda, in particolare alla lunghezza d'onda di 515 nm, o mediante un rivelatore UV-visibile a lunghezza d'onda fissa e selezionato per l'acquisizione alla lunghezza d'onda di 515 nm, o mediante un rivelatore



spettrometrico di massa selezionato per l'acquisizione di ioni primari di peso molecolare di 449 e 535 unità di massa atomica (u.m.a.).

Il metodo secondo l'invenzione può comprendere ulteriormente una fase f) di evaporazione e condensazione della soluzione ottenuta dopo la fase e) di purificazione.

Costituisce ulteriore oggetto della presente invenzione un estratto arricchito in C-3-G e suoi derivati esente da sostanze tossiche comprendente almeno da 50 a 95%, preferibilmente 70-93%, ancora più preferibilmente 90% di C-3-G e suoi derivati, ad esempio cianidina-3-O- $\beta$ -glucopiranoside e/o cianidina-3-O- $\beta$ -glucopiranoside malonilata, rispetto al contenuto presente nel succo di partenza, ottenibile mediante il metodo come definito sopra comprendente le fasi a), b) e c) e/o d). L'estratto può comprendere ulteriormente vitamina C (acido ascorbico).

L'estratto secondo l'invenzione può essere vantaggiosamente impiegato in campo medico, pertanto costituisce ulteriore oggetto della presente invenzione una composizione comprendente come principio attivo l'estratto come definito sopra assieme ad almeno un eccipiente e/o un adiuvante

farmaceuticamente accettabili. L'invenzione concerne inoltre l'uso dell'estratto come definito sopra per la preparazione di un integratore alimentare o di un medicamento antiossidante, antiinvecchiamento, ad attività differenziante delle cellule tumorali, ad azione protettiva dei tessuti post-ischemici.

Inoltre, costituisce ulteriore oggetto dell'invenzione un integratore alimentare comprendente l'estratto dell'invenzione.

Il metodo secondo l'invenzione permette inoltre la purificazione di cianidina-3-O- $\beta$ -glucopiranoside e cianidina-3-O- $\beta$ -glucopiranoside malonilata ad un grado di purezza di circa il 99%, che può pertanto essere vantaggiosamente impiegata per la preparazione di formulazioni farmaceutiche costituite da cianidina-3-O- $\beta$ -glucopiranoside, o cianidina-3-O- $\beta$ -glucopiranoside malonilata, o cianidina-3-O- $\beta$ -glucopiranoside + cianidina-3-O- $\beta$ -glucopiranoside malonilata in proporzioni variabili, da applicare per gli usi terapeutici che sfruttano le proprietà biologiche note dei composti contenenti cianidina (antiossidanti, antiinvecchiamento, reologiche, differenzianti delle cellule tumorali, protettive dei tessuti post-ischemici, ecc.).

La presente invenzione verrà ora descritta a titolo illustrativo, ma non limitativo, secondo sue forme preferite di realizzazione, con particolare riferimento alle figure dei disegni allegati, in cui:

Figura 1 mostra il tracciato cromatografico alla lunghezza d'onda di 515 nm del filtrato liofilizzato, ridisciolti in acqua e sottoposto a cromatografia HPLC in fase inversa come descritto nell'Esempio 1, in cui sono ben visibili 2 picchi principali con tempi di ritenzione di 12,11 e 15,08 minuti. Tali tempi di ritenzione risultano corrispondenti, rispettivamente, a C-3-G e C-3-G malonilata standard.

Figura 2 illustra lo spettro di assorbimento del picco di Figura 1 con tempo di ritenzione di 12,11 minuti che presenta due massimi di assorbimento a 275 e 515 nm (quest'ultimo nella zona dello spettro caratteristica dei composti contenenti cianidina) sovrapponibile a quello della C-3-G standard.

Figura 3 illustra lo spettro di assorbimento del picco di Figura 1 con tempo di ritenzione di 15,08 minuti che presenta due massimi di assorbimento a 275 e 520 nm (quest'ultimo nella zona dello spettro caratteristica dei composti contenenti cianidina)

sovrapponibile a quello della C-3-G malonilata standard.

Figura 4 mostra lo spettro di massa, ottenuto utilizzando uno spettrometro di massa per HPLC con tecnologia a trappola ionica, collegato in parallelo al rivelatore spettrofotometrico, che indica per il picco della Figura 1 con tempo di ritenzione = 12,11 min un peso molecolare di 449 Da, cioè il peso molecolare della C-3-G.

Figura 5 mostra lo spettro di massa, ottenuto utilizzando uno spettrometro di massa per HPLC con tecnologia a trappola ionica, collegato in parallelo al rivelatore spettrofotometrico, che indica per il picco della Figura 1 con tempo di ritenzione = 15,08 min un peso molecolare di 535 Da, cioè il peso molecolare della C-3-G malonilata.

Figura 6 mostra l'effetto protettivo di concentrazioni crescenti dei picchi purificati di C-3-G e C-3-G malonilata da succo di arancia rossa nei confronti della perossidazione di LDL umane indotta da ioni rame. Le due curve di protezione risultano sovrapponibili indicando un uguale potere antiossidante dei due composti, che risulta non compromesso dal processo di purificazione.

Esempio 1: Estrazione di cianidina secondo il metodo dell'invenzione ed analisi dell'estratto

Il procedimento di purificazione della C-3-G, allo scopo di ottenere la molecola a un grado di purezza utilizzabile per la preparazione di formulazioni farmaceutiche a base di C-3-G, è stato messo a punto in laboratorio e necessita dell'opportuno "scale up" per passare a livello di impianto pilota e successivamente di processo industriale.

La procedura di laboratorio è stata condotta a partire da due litri di succo di arance rosse di Sicilia, contenenti 1,1 mmoli di cianidine totali/litro di succo e 3 mmoli di acido ascorbico/litro di succo, sono stati centrifugati (5000 rpm per 15 minuti a 4 °C) per rimuovere tutto il particolato presente e formatosi a seguito del processo di spremitura. Il sopranatante ottenuto è stato sottoposto ad un processo di osmosi inversa utilizzando una cartuccia contenente una membrana polimerica di acetato di cellulosa a flusso tangenziale a spirale avvolta (con un taglio molecolare di filtrazione per soluti non carichi di 300 Da). La configurazione a spirale avvolta è scelta per la sua efficienza ed economia, ideale per un

**BARZANÒ & ZANARDO ROMA SpA**

processo di produzione industriale in cui elevate quantità di liquido devono essere filtrate con la massima efficienza, nel più breve tempo possibile e al minor costo possibile. Il succo di arancia rossa da trattare è stato alimentato in pressione da un lato dell'elemento alle condizioni massime indicate dai fornitori del sistema di filtraggio (27 bar, permeabilità 10-14 litri/h m<sup>2</sup>). Per effetto della componente radiale della pressione, parte del liquido contenente i soluti non ionici con peso uguale o inferiore a 300 Da è permeato attraverso la membrana mentre, per effetto della componente tangenziale della pressione, il liquido non permeato, contenente i soluti ionici con peso uguale o superiore a 300 Da è stato spinto verso l'uscita della membrana.

Il filtrato ottenuto è stato quindi analizzato per determinare il contenuto in C-3-G e acido ascorbico e permettere di calcolare la resa del processo di osmosi inversa. A tale scopo, un'aliquota pari a 200 µl è stata analizzata in HPLC ad accoppiamento ionico per la determinazione del contenuto di acido ascorbico (20) e altri 200 µl sono stati analizzati mediante dosaggio spettrofotometrico diretto (4) per la determinazione del contenuto in cianidine totali. Per la determinazione del contenuto

di acido ascorbico, si è utilizzato un sistema HPLC in bassa pressione equipaggiato con un rivelatore spettrofotometrico UV-visibile a serie di diodi dotato di cella di flusso di 5 cm di cammino ottico per aumentare la sensibilità del sistema di rivelazione, mentre per la determinazione delle cianidine totali si è adoperato uno spettrofotometro monoraggio Beckman DU-7. Le analisi hanno permesso di riscontrare una concentrazione di 1,0 mmoli di cianidine totali/litro di filtrato e 1,5 mmoli di acido ascorbico/litro di filtrato. In base a tali risultati, si è proceduto ad analizzare il permeato che avrebbe dovuto contenere i soluti non ionici con peso molecolare inferiore o uguale a 300 Da. Le analisi in questione hanno mostrato tracce inferiori a 0,1 mmoli di cianidine totali e una quantità di ascorbato pari a quella rinvenuta nel filtrato (1,5 mmoli/litro). Come da previsione, fino a questo step del processo di purificazione, la resa relativa alle cianidine totali è stata pari a circa il 91% del quantitativo totale iniziale di cianidina mentre, per l'acido ascorbico, la resa è stata del 50%. Tale dato è da attribuirsi al peso molecolare dell'acido ascorbico inferiore a quello del taglio molecolare della membrana utilizzata. Solo la carica netta

posseduta dall'acido ascorbico ha permesso di ottenere nel filtrato anche un quantitativo significativo di questo antiossidante naturale.

Il passaggio successivo è stato rappresentato da un procedimento di liofilizzazione del filtrato. A tale scopo, il filtrato (circa 1 litro di soluzione contenente 1 mmole di cianidine totali e 1,5 mmoli di acido ascorbico) è stato congelato a  $-80^{\circ}\text{C}$  e successivamente collegato ad un liofilizzatore da laboratorio Edwards con piastra raffreddante a  $-80^{\circ}\text{C}$  e depressurizzazione della camera di liofilizzazione a  $1 \times 10^{-3}$  mbar. Un'aliquota del prodotto liofilizzato, altamente idrosolubile, è stato ridisciolti in acqua in modo da ottenere una soluzione 0,1 mM in cianidina che è stata sottoposta a separazione analitica su una colonna per HPLC in fase inversa ODS C-18, con particelle da 5  $\mu\text{m}$ , lunghezza 250 mm e diametro interno di 4,6 mm. La strumentazione HPLC è quella sopra descritta e la separazione della C-3-G è stata effettuata con un gradiente a salti utilizzando due eluenti aventi la seguente composizione: eluente A (per un litro), 100 ml  $\text{HCOOH}$  e 900 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ; eluente B (per un litro), 50 ml  $\text{HCOOH}$ , 450 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 500 ml  $\text{CH}_3\text{OH}$ . Il gradiente a salti era così configurato: 3 minuti di eluizione



isocratica con il 100% di eluente A; 1 minuto fino al 90 % di eluente A; 16 minuti fino allo 0% di eluente A. Il flusso della corsa è stato mantenuto costante a 1.2 ml/min e la temperatura a 23 °C. Il rivelatore spettrofotometrico a serie di diodi è stato selezionato per l'acquisizione delle corse cromatografiche tra 200 e 600 nm di lunghezza d'onda. In queste condizioni cromatografiche, alla lunghezza d'onda di 515 nm (caratteristica dei composti contenenti cianidina), sono risultati 2 picchi principali aventi tempo di ritenzione e spettro di assorbimento caratteristici, rispettivamente, della C-3-G standard e della C-3-G malonilata standard, di cui uno con un tempo di ritenzione di circa 12 minuti ed uno con tempo di ritenzione di circa 15 minuti (Figura 1).

Per il picco con tempo di ritenzione di circa 12 minuti (12,11 min), lo spettro di assorbimento ha presentato due massimi di assorbimento, uno a 275 e uno a 515 nm, quest'ultimo nella regione caratteristica dei composti contenenti cianidina, ed è risultato sovrapponibile a quello di C-3-G standard (Fig. 2).

Per il picco con tempo di ritenzione di circa 15 minuti (15,08 min), lo spettro di assorbimento ha

presentato due massimi di assorbimento, uno a 280 e uno a 520 nm, quest'ultimo nella regione caratteristica dei composti contenenti cianidina, ed è risultato sovrapponibile a quello di C-3-G malonilata standard (Fig. 3).

L'analisi dello spettro di massa, ottenuto utilizzando uno spettrometro di massa per HPLC con tecnologia a trappola ionica, collegato in parallelo al rivelatore spettrofotometrico, ha indicato per il picco della Figura 1 con tempo di ritenzione = 12,11 min un peso molecolare di 449 Da, cioè il peso molecolare della C-3-G (Figura 4).

L'analisi dello spettro di massa, ottenuto utilizzando uno spettrometro di massa per HPLC con tecnologia a "trappola ionica", collegato in parallelo al rivelatore spettrofotometrico, ha indicato per il picco della Figura 1 con tempo di ritenzione = 15,08 min un peso molecolare di 535 Da, cioè il peso molecolare della C-3-G malonilata (Figura 5).

Le rispettive concentrazioni nel filtrato liofilizzato della C-3-G e della C-3-G malonilata sono quindi risultate di 0,6 e 0,4 mmoli, rispettivamente. Va sottolineato che il filtrato liofilizzato conteneva anche il 50% dell'acido

ascorbico di partenza, e cioè circa 1,6 mmoli. Per il filtrato liofilizzato, ridisciolti e successivamente sottoposto a cromatografia HPLC in fase inversa, in entrambi i picchi raccolti contenenti C-3-G e C-3-G malonilata, si è ottenuto un livello di purezza (basato sugli indici sopra riportati e cioè, spettro di assorbimento e spettro di massa) superiore al 99%.

Per il passaggio alla produzione industriale, vale la pena di ricordare che possono essere utilizzate le formule sotto riportate al fine di ottimizzare il processo di scale-up:

$$\text{Fattore di scale-up} = \frac{(\text{diametro col. preparativa})^2 \times \text{lunghezza col. preparativa}}{(\text{diametro col. analitica})^2 \times \text{Lunghezza col. Analitica}}$$

$$\text{Range di flusso prep} = \text{range di flusso analitico} \times \frac{(\text{diametro col. preparativa})^2}{(\text{diametro col. analitica})^2}$$

Durata del Grad. Prep =

$$\text{Durata grad. analitico} \times \frac{\text{lunghezza col. prep.}}{\text{lunghezza col anal.}} \times \frac{(\text{diam. col. prep})^2}{(\text{diam. col. anal.})^2} \times \frac{\text{range flusso anal.}}{\text{range flusso prep}}$$

Nella tabella 1 sono riportati alcuni esempi.

Tabella 1

Diametro colonna (µm)	Fattore di scale-up	Quantità tipica di soluto presente nel campione iniettato
4,6	1,0	1 - 4 mg
10,0	4,7	5 - 25 mg
21,4	21,6	22 - 88 mg
41,4	81,0	81 - 324 mg
77,0	280,0	287 - 1150 mg

100,0	472,0	0,47 - 1,89 g
150,0	1060,0	1,06 - 4,24 g

Successivamente, si è proceduto a effettuare corse cromatografiche ripetute del filtrato liofilizzato ridiscioltto, provvedendo per ogni corsa a raccogliere separatamente i volumi dei picchi di eluizione relativi a C-3-G e C-3-G malonilata.

A livello del procedimento di produzione industriale, visto il particolare utilizzo delle sostanze sopra citate nella purificazione per ottenere C-3-G, diventa necessaria e conveniente la rimozione ed il successivo recupero della soluzione metanolo/acido formico, utilizzata per l'eluizione e purificazione cromatografica della C-3-G. Per questo motivo si rende necessaria una evaporazione e condensazione della soluzione, operante in un range di temperatura e pressione che non degradi il principio attivo e che non crei problemi di sicurezza ed assimilabilità del prodotto finale.

Pertanto si è pensato ad un sistema semi-automatico di evaporazione e successiva condensazione, che potrà, in un secondo tempo essere completamente automatizzato ed inserito in un processo industriale di produzione. Il sistema potrà operare a temperature comprese tra 25 e 35°C con una pressione di sottovuoto da 0,05 a 1 mbar, valori che

garantiscono la completa distillazione della miscela metanolo/acido formico con un recupero di circa il 97-98,5% e con un piccolo trascinamento di acqua pari al 2-3 %.

La portata di distillazione del metanolo a 25°C, con una carica di ca. 10 l, è di ca. 2-2,5 l/h. Il distillato metanolo/acido formico così ottenuto, dopo preventivo controllo, può essere riciclato per la preparazione degli eluenti da utilizzare nel processo di purificazione cromatografica della C-3-G. E' importante sottolineare che il processo di distillazione della miscela metanolo/acido formico, può essere interrotto a partire dalla eliminazione di almeno il 60-70% della quantità iniziale presente, dato che il rimanente quantitativo risulta rimuovibile attraverso la liofilizzazione necessaria per ottenere la preparazione finale, stabile e purificata, della C-3-G o della miscela C-3-G + C-3-G malonilata.

Nel caso dell'esperienza di laboratorio descritta, entrambi i volumi di raccolta sono stati inizialmente sottoposti a evaporazione sotto vuoto a 25 °C con un sistema Rotavapor della Buchi, congelati a -80 °C e nuovamente liofilizzati e ridisciolti con un volume di acqua tale da ottenere una

concentrazione 1 mM per entrambi i composti. Aliquote di queste soluzioni di C-3-G e C-3-G malonilata sono state utilizzate per valutare "l'integrità" biologica delle molecole purificate attraverso un test volto a determinare il loro potere antiossidante. A questo scopo, LDL umane purificate sono state sospese in un opportuno tampone salino e dializzate estensivamente. La sospensione di LDL è stata suddivisa in diverse aliquote, le quali sono state addizionate con diverse concentrazioni di C-3-G o C-3-G malonilata purificate come sopra riportato (1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 e 200  $\mu$ M). Le LDL incubate senza aggiunta di alcun antiossidante hanno rappresentato il controllo.

Le miscele così ottenute, sono state quindi sottoposte ad ossidazione causata dall'aggiunta di rame 40  $\mu$ M. Il sistema così composto è stato incubato a 37 °C per 24 ore al termine delle quali si è determinato il livello di perossidazione lipidica delle LDL indotta dal rame, attraverso la valutazione della malondialdeide (MDA) prodotta.

Per determinare l'MDA, i campioni prelevati dalle varie miscele di incubazione sono stati trattati con acetonitrile per precipitare le proteine e successivamente estratti con cloroformio purissimo, per la rimozione di tutti i composti liposolubili.

Dopo tre estrazioni con cloroformio è stata prelevata la fase acquosa contenente tutta l'MDA generata durante il processo di perossidazione delle LDL indotto dagli ioni rame. Aliquote della fase acquosa così ottenuta sono state analizzate mediante HPLC per la determinazione diretta dell'MDA. I risultati riportati nella Fig. 6 dimostrano chiaramente che il processo cui è stato sottoposto il succo di arancia rossa per l'estrazione e purificazione della C-3-G non ne ha alterato né la struttura chimica (per esempio, attraverso un processo di perdita del residuo glicosidico con formazione dell'aglicone corrispondente che non è stato riscontrato in quantità apprezzabili nelle varie analisi cromatografiche effettuate durante tutte le fasi del procedimento di purificazione) né ha causato la perdita delle sue proprietà biologiche di molecola fortemente antiossidante (per esempio, attraverso un processo di ossidazione che si sarebbe potuto instaurare durante la fase di purificazione).

Inoltre, i dati di Fig. 6 indicano anche che C-3-G e C-3-G malonilata sono dotate della stessa efficacia antiossidante, permettendo di ipotizzare la formulazione di un preparato farmaceutico costituito

da C-3-G e C-3-G malonilata purificate attraverso il procedimento sopra descritto.

E' importante sottolineare che, sottoponendo il succo di arancia rossa ai passaggi di purificazione su indicati, è possibile interrompere il processo al termine della prima liofilizzazione del filtrato, ottenuto dopo la procedura di osmosi inversa o di ultrafiltrazione/nanofiltrazione. In tal modo, è possibile ottenere un prodotto liofilizzato arricchito in C-3-G (che ne rappresenta circa il 60% del contenuto di cianidine totali), in C-3-G malonilata (che ne rappresenta circa il 40% del contenuto di cianidine totali), e acido ascorbico, in quantità pari a circa il 50% del contenuto presente nel succo di partenza, che può senz'altro trovare una sua commercializzazione come integratore alimentare a base di antocianine e vitamina C. Va sottolineato che in tale estratto la C-3-G e il suo derivato malonilato si ritrovano in quantità pari a circa il 90% del quantitativo presente nel succo di partenza.

E' importante sottolineare che, sottoponendo il succo di arancia rossa ai passaggi di purificazione su indicati, è possibile sottoporre il filtrato, ottenuto dopo la procedura di osmosi inversa o di ultrafiltrazione/nanofiltrazione, direttamente al



processo cromatografico di purificazione di C-3-G e C-3-G malonilata, ottimizzando tempi di produzione e rese delle due sostanze contenenti cianidina ad un livello di purezza attorno al 99%, utilizzabili per la preparazione di formulazioni farmaceutiche aventi come principi attivi C-3-G, C-3-G malonilata o una combinazione, in percentuali uguali o differenti, di C-3-G e C-3-G malonilata.

#### BILIOGRAFIA

- 1) M.T. Satué-Gracia, M. Heinonen and E.N. Frankel (1997) Anthocyanins as antioxidants on human low-density lipoprotein and lecithin-liposome systems. J. Agr. Food Chem. 45: 3362-3367.
- 2) F.J. Francis (1989) Food colorants: anthocyanins. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 28: 273-314.
- 3) N. Terahara, M. Yamaguchi and T. Honda (1994) Malonylated anthocyanins from bulbs of red onion, *Allium cepa* L. Biosci. Biotechnol. Biochem. 58: 1324-1325.
- 4) P. Rapisarda and A. Giuffrida (1992) Anthocyanin levels in italian blood oranges. Proc. Int. Soc. Citricult. 3: 1130-1133.
- 5) B.M. Ames (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative disease. Science: 221, 1256-1263.

6) B.M. Ames, M.K. Shigena and T.M. Hagen (1993) Oxidants, antioxidants and the degenerative disease of aging. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90: 7915-7922.

7) S.A.B.E. van Acker, M.N.J.L Tromp, G.R.M.M. Haenen, W.J.F. van der Vijgh and A. Bast (1995) Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. Biochem. Biophys. Res. Commun. 214: 755-759.

8) C. Rice-Evans, N.J. Miller, P.G. Bolwell, P.M. Bramley and J.B. Pridham (1995) The relative antioxidant activity of plant-derived polyphenolic flavonoids. Free Rad. Res. 22: 375-383.

9) T.P. Whitehead, D. Robinson, S. Allaway, J. Syms and A. Hale (1995) Effect of red wine on the antioxidant capacity of serum. Clin. Chem. 41: 32-35.

10) H. Wang, G. Cao and R.L. Prior (1997) Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. J. Agricult. Food Chem. 45: 304-309.

11) C. Rice-Evans, N.J. Miller and G. Paganga (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Rad. Biol. Med. 20: 933-956.

12) T. Tsuda, K. Shiga, K. Ohshima, S. Kawakishi and T. Osawa (1996) Inhibition of lipid peroxidation and the active oxygen radical scavenging effect of

anthocyanin pigments isolated from *Phaseolus vulgaris*  
L. *Biochem. Pharmacol.* 52: 1033-1039.

13) T. Tsuda, F. Horio and T. Osawa (1998)  
Dietary cyanidin 3-O-beta-D-glucoside increases ex  
vivo oxidation resistance of serum in rats. *Lipids*:  
33, 583-588.

14) T. Tsuda, F. Horio, J. Kito and T. Osawa  
(1999) Protective effects of dietary cyanidin 3-O-  
beta-D-glucoside on liver ischemia-reperfusion injury  
in rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 368: 361-366.

15) H. Wang, M.G. Nair, G.M. Strasburg, Y.C.  
Chang, A.M. Booren, J.I. Gray and D.L. DeWitt (1999)  
Antioxidant and antiinflammatory activities of  
anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart  
cherries. *J. Nat. Prod.* 62: 294-296.

16) A.M. Amorini, G. Fazzina, G. Lazzarino, B.  
Tavazzi, D. Di Pierro, R. Santucci, F. Sinibaldi, F.  
Galvano, G. Galvano (2001) Activity and mechanism of  
the antioxidant properties of cyanidin-3-O-b-  
glucopyranoside. *Free Rad. Res.* 35: 953-966.

17) A.M. Amorini, G. Fazzina, G. Lazzarino, B.  
Tavazzi, F. Galvano, G. Galvano (2003) Cyanidin-3-O-  
b-glucopyranoside protects myocardium and  
erythrocytes from oxygen radical-mediated damages.  
*Free Rad. Res.* 37: 453-460.

18) F. Galvano, L. La Fauci, G. Lazzarino, V. Fogliano, A. Ritieni, S. Ciappellano, N.C. Battistini, B. Tavazzi, G. Galvano (2004) Cyanidins: metabolism and biological properties. J. Nutr. Biochem.. 15: 2-11.

19) A. Serafino, P. Sinibaldi Vallebona, G. Lazzarino, B. Tavazzi, G. Rasi, P. Pierimarchi, F. Andreola, G. Moroni, G. Galvano, F. Galvano, E. Garaci (2004) Differentiation of human melanoma cells induced by cyanidin-3-O-b-glucopyranoside FASEB J. 27: 1940-1955.

20) G. Lazzarino, D. Di Pierro, B. Tavazzi, L. Cerroni, B. Giardina (1991) Simultaneous separation of malondialdehyde, ascorbic acid, and adenine nucleotide derivatives from biological samples by ion-pairing high-performance liquid chromatography. Anal. Biochem. 197: 191-196.

UN MANDATARIO  
per se e per gli altri

Serena Gitto  
(N° d'iscr. 962B)

*Serena Gitto*



**BARZANO & ZANARDO ROMA SpA**

RIVENDICAZIONI

1. Metodo per la preparazione di un estratto arricchito in cianidina-3-O- $\beta$ -glucopiranoside e suoi derivati da frutti o vegetali contenenti detti composti, comprendente le seguenti fasi:

a) raccolta del succo dai frutti o vegetali e rimozione dell'eventuale presenza di particolato;

b) filtrazione del liquido ottenuto nella fase a) mediante osmosi inversa o mediante ultrafiltrazione/nanofiltrazione che impiegano una membrana con un taglio molecolare di filtrazione per soluti non carichi da 100 a 800 Da; e

c) raccolta del filtrato.

2. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui la membrana ha un taglio molecolare di filtrazione da 200 a 500 Da.

3. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti in cui la membrana ha un taglio molecolare di filtrazione di 300 Da.

4. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti, che comprende ulteriormente la fase d) di liofilizzazione del filtrato.

5. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti, che comprende ulteriormente la fase e) di purificazione della cianidina-3-O- $\beta$ -glucopiranoside e

dei suoi derivati successivamente o alternativamente alla fase c).

6. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti in cui i frutti sono scelti nel gruppo che consiste in arancia rossa, fragola, mirtillo, mora, ciliegia, gelso nero, lampone, cocomero, uva nera, uva fragola.

7. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti in cui i vegetali sono scelti nel gruppo che consiste in rabarbaro, rapa rossa, cipolla rossa, riso rosso.

8. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti in cui la fase di raccolta del succo dai frutti o vegetali avviene mediante spremitura.

9. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti in cui la rimozione dell'eventuale presenza di particolato avviene mediante centrifugazione o semplice filtrazione attraverso un setto filtrante di materiale inerte.

10. Metodo secondo la rivendicazione 9, in cui il materiale inerte è scelto nel gruppo che consiste in vetro poroso, garze filtranti, carta filtrante.

11. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti in cui la membrana per l'osmosi inversa è polimerica.

12. Metodo secondo la rivendicazione 11, in cui il polimero della membrana è scelto dal gruppo che consiste in acetato di cellulosa, poliammide, polieteresulfone.

13. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti in cui la membrana polimerica per l'osmosi inversa è scelta nel gruppo che consiste in membrana a flusso tangenziale a spirale avvolta, membrana a fibre cave.

14. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti in cui la filtrazione è condotta ad una pressione da 5 a 40 bar e permeabilità da 3 a 23 litri/ore  $m^2$ .

15. Metodo secondo la rivendicazione 14, in cui la filtrazione è condotta ad una pressione da 15 a 35 bar e permeabilità da 8 a 18 litri/ore  $m^2$ .

16. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti in cui la filtrazione è condotta ad una pressione di 27 bar e permeabilità da 10 a 14 litri/ore  $m^2$ .

17. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti in cui la fase d) di liofilizzazione del filtrato è condotta ad una temperatura da  $-100$  a  $-60^{\circ}C$  e ad una pressione da  $0,01 \times 10^{-3}$  mbar a  $10 \times 10^{-3}$  mbar.

18. Metodo secondo la rivendicazione 17, in cui la fase d) di liofilizzazione del filtrato è condotta ad una pressione da  $0,1 \times 10^{-3}$  mbar a  $5 \times 10^{-3}$  mbar.

19. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti in cui la fase d) di liofilizzazione del filtrato è condotta a  $-80^{\circ}\text{C}$  e a  $1 \times 10^{-3}$  mbar.

20. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti, in cui la purificazione della cianidina è condotta mediante cromatografia HPLC in fase inversa.

21. Metodo secondo la rivendicazione 20, in cui la HPLC prevede l'impiego di una colonna in fase inversa ODS C-18 con particelle da  $5\text{ }\mu\text{m}$ , lunghezza 250 mm e diametro interno di 4,6 mm.

22. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti in cui la cromatografia HPLC in fase inversa è effettuata utilizzando un gradiente a salti mediante l'impiego di due eluenti, rispettivamente, eluente A contenente un acido organico volatile in concentrazione compresa tra 25 e 250 ml/l e acqua a complemento del volume di un litro ed eluente B contenente un acido organico volatile in concentrazione compresa tra 10 e 100 ml/l, un alcool primario, secondario o terziario in concentrazione compresa tra 300 e 800 ml/l, e acqua a complemento del volume di un litro; il gradiente a salti essendo



ottenuto nel seguente modo: eluizione isocratica con il 100% di eluente A della durata minima di 1 minuto e massima di 15 minuti; da 0,5 a 5 minuti fino a raggiungere una percentuale di tampone A compresa tra 95% e 80%; da 5 a 50 minuti fino a raggiungere una percentuale di tampone A compresa tra 50% e 0%; il flusso della corsa cromatografica essendo mantenuto costante ad una velocità compresa tra 0,8 e 1,8 ml/min; la temperatura essendo anch'essa mantenuta costante a valori compresi tra 0 e 30 °C.

23. Metodo secondo la rivendicazione 22, in cui l'acido organico volatile dell'eluente A è in concentrazione da 50 a 200 ml/l.

24. Metodo secondo la rivendicazione 23, in cui l'acido organico volatile dell'eluente A è in concentrazione di 100 ml/l.

25. Metodo secondo la rivendicazione 22, in cui l'acido organico volatile dell'eluente B è in concentrazione da 25 a 75 ml/l.

26. Metodo secondo la rivendicazione 25, in cui l'acido organico volatile dell'eluente B è in concentrazione di 50 ml/l.

27. Metodo secondo la rivendicazione 22, in cui l'alcol dell'eluente B è in concentrazione da 400 a 700 ml/l.

28. Metodo secondo la rivendicazione 27, in cui l'alcol dell'eluente B è in concentrazione di 500 ml/l.

29. Metodo secondo la rivendicazione 22, in cui il flusso è ad una velocità compresa tra 1,0 e 1,5 ml/min.

30. Metodo secondo la rivendicazione 29, in cui il flusso è ad una velocità di 1,2 ml/min.

31. Metodo secondo la rivendicazione 22, in cui la temperatura è compresa tra 8 e 25 °C.

32. Metodo secondo la rivendicazione 31, in cui la temperatura è di 23 °C.

33. Metodo secondo la rivendicazione 22, in cui l'acido organico volatile è scelto nel gruppo che consiste in acido formico, malonico, ossalico, succinico, trifluoroacetico, tricloroacetico, acetico.

34. Metodo secondo la rivendicazione 22, in cui l'alcool è scelto nel gruppo che consiste in metanolo, etanolo, n-butanolo, alcool sec-butilico, alcool tert-butilico, propanolo, isopropanolo.

35. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti in cui la rivelazione spettrofotometrica è condotta mediante un rivelatore a serie di diodi selezionato per l'acquisizione delle corse cromatografiche tra 200 e 600 nm di lunghezza d'onda,

o con un rivelatore UV-visibile a lunghezza d'onda fissa o mediante un rivelatore spettrometrico di massa selezionato per l'acquisizione di ioni primari di peso molecolare di 449 e 535 unità di massa atomica (u.m.a.).

36. Metodo secondo la rivendicazione 35, in cui la rivelazione è condotta alla lunghezza d'onda di 515 nm.

37. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni precedenti, che comprende ulteriormente una fase f) di evaporazione e condensazione della soluzione ottenuta dopo la fase e) di purificazione.

38. Estratto arricchito in cianidina esente da sostanze tossiche comprendente almeno dal 50 al 95% di cianidina-3-O- $\beta$ -glucopiranoside e di suoi derivati contenuti nel succo di partenza, ottenibile mediante il metodo come definito in ognuna delle rivendicazioni 1-3 ed, opzionalmente 4.

39. Estratto secondo la rivendicazione 38, comprendente almeno dal 70 al 93% di cianidina-3-O- $\beta$ -glucopiranoside e di suoi derivati contenuti nel succo di partenza.

40. Estratto secondo la rivendicazione 39, comprendente almeno il 90% di cianidina-3-O- $\beta$ -

glucopiranoside e di suoi derivati contenuti nel succo di partenza.

41. Estratto secondo ognuna delle rivendicazioni 38-40, che comprende ulteriormente vitamina C (acido ascorbico).

42. Estratto secondo ognuna delle rivendicazioni 38-41, in cui la cianidina è scelta nel gruppo che consiste in cianidina-3-O- $\beta$ -glucopiranoside, cianidina-3-O- $\beta$ -glucopiranoside malonilata.

43. Estratto secondo ognuna delle rivendicazioni 38-42, per l'uso in campo medico.

44. Composizione comprendente come principio attivo l'estratto come definito nelle rivendicazioni 38-42 assieme ad almeno un eccipiente e/o un adiuvante farmaceuticamente accettabili.

45. Integratore alimentare comprendente l'estratto come definito nelle rivendicazioni 38-42.

46. Uso dell'estratto come definito nelle rivendicazioni 38-42 per la preparazione di un integratore alimentare.

47. Uso dell'estratto come definito nelle rivendicazioni 38-42 per la preparazione di un medicamento antiossidante.

48. Uso dell'estratto come definito nelle rivendicazioni 38-42 per la preparazione di un medicamento antiinvecchiamento.

49. Uso dell'estratto come definito nelle rivendicazioni 38-42 per la preparazione di un medicamento ad attività differenziante delle cellule tumorali.

50. Uso dell'estratto come definito nelle rivendicazioni 38-42 per la preparazione di un medicamento ad azione protettiva dei tessuti post-ischemici.

Roma, **28 APR. 2006**

p.p.: Giuseppe LAZZARINO, Barbara TAVAZZI, Fabrizio LORENZI, Angela Maria AMORINI, Bruno GIARDINA, Valentina DI PIETRO

BARZANO' & ZANARDO ROMA S.p.A.

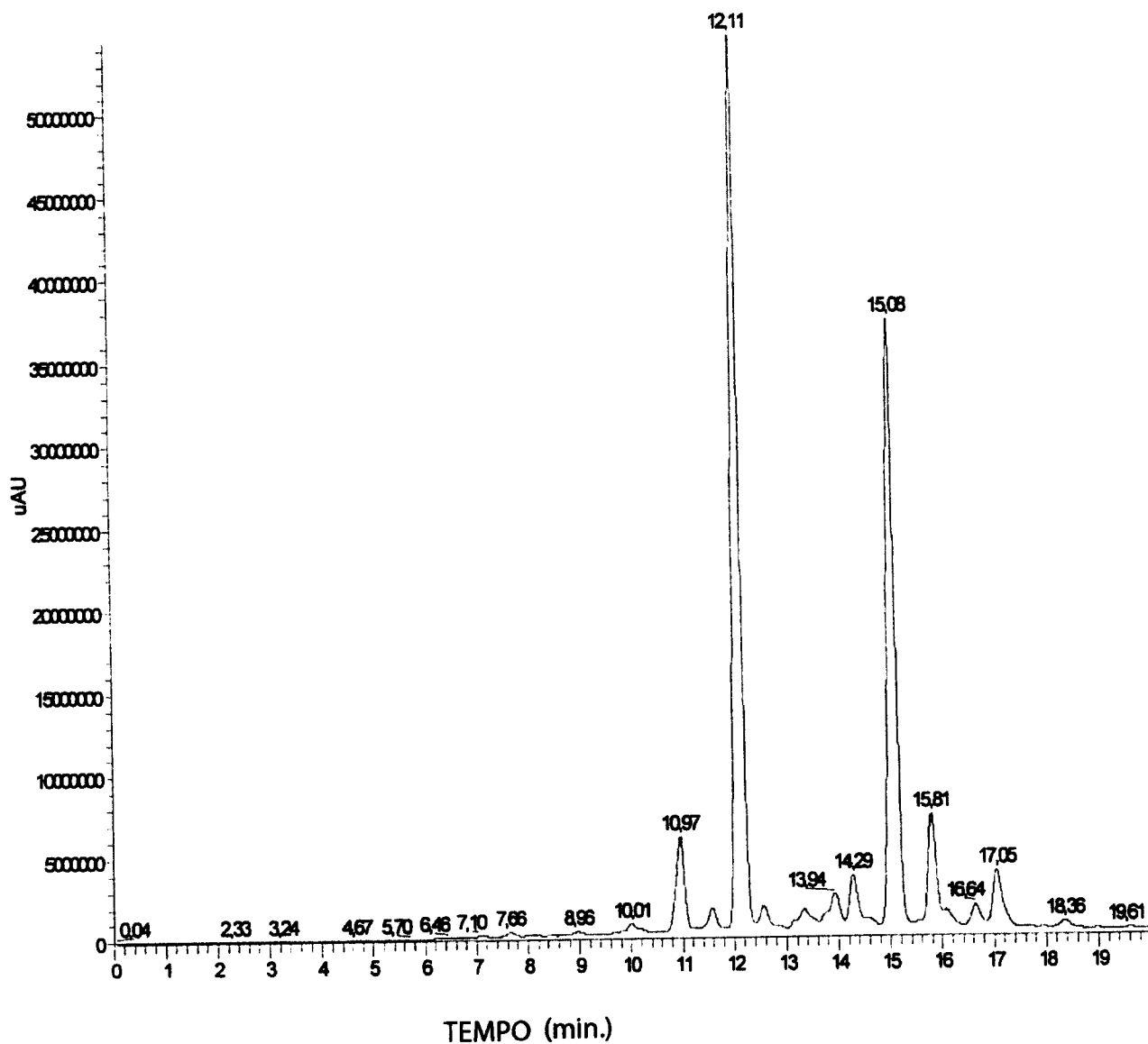
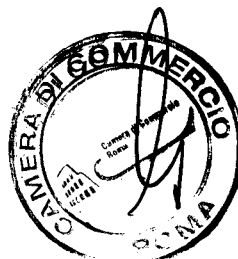
UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
**Serena Gitto**  
(N° d'iscr. 962B)

SG

*Serena Gitto*



**BARZANO' & ZANARDO ROMA SpA**

**Fig. 1**

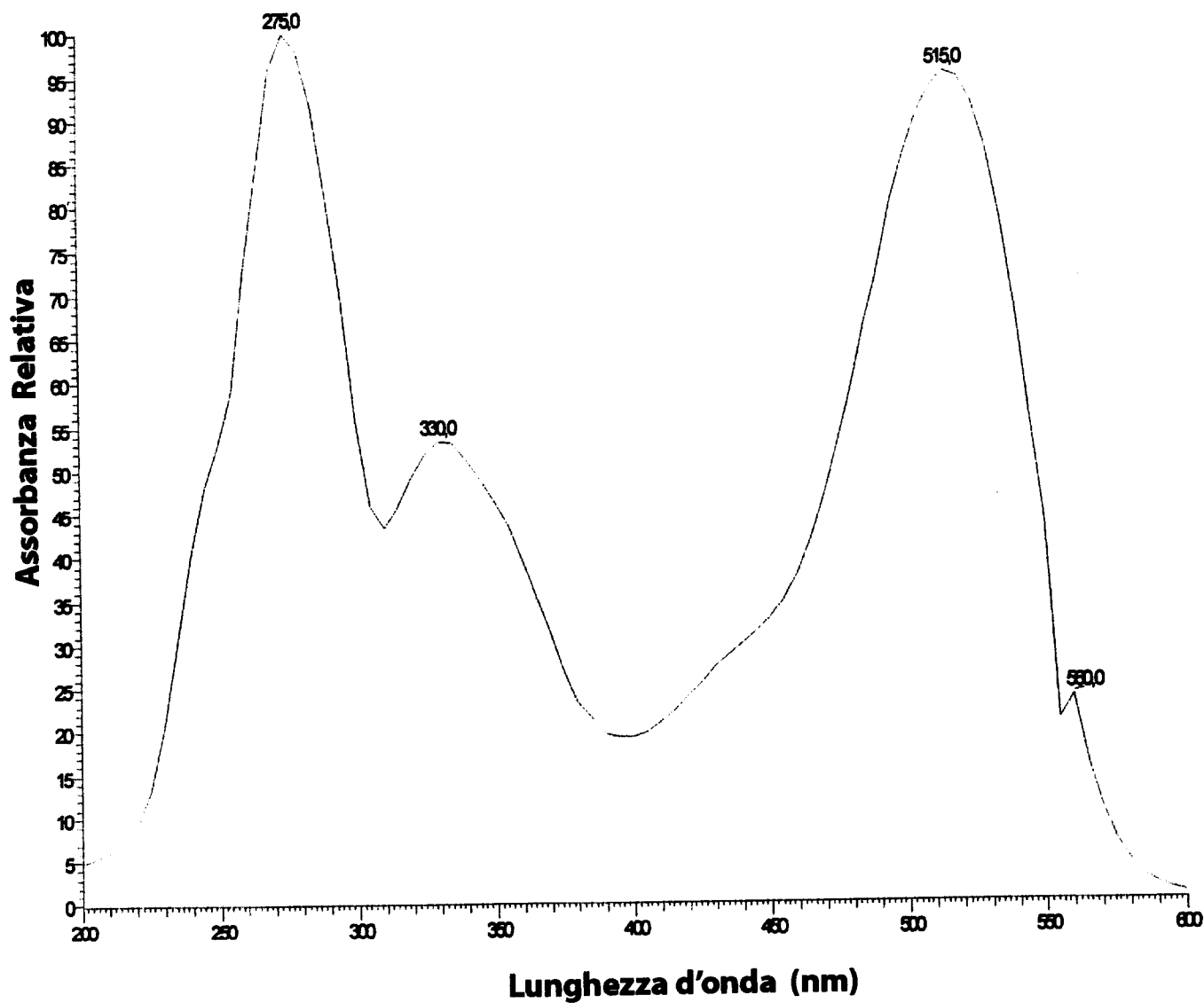
p.p.: LAZZARINO Giuseppe, TAVAZZI Barbara, LORENZI Fabrizio,  
AMORINI Angela Maria, GIARDINA Bruno, DI PIETRO Valentina  
Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

UN MANDATO  
per sé e per gli altri  
**Antonio Talierno**  
(N° d'ist. 171)

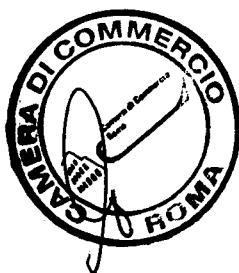
*Talierno*

RMV0551

2/6



**Fig. 2**



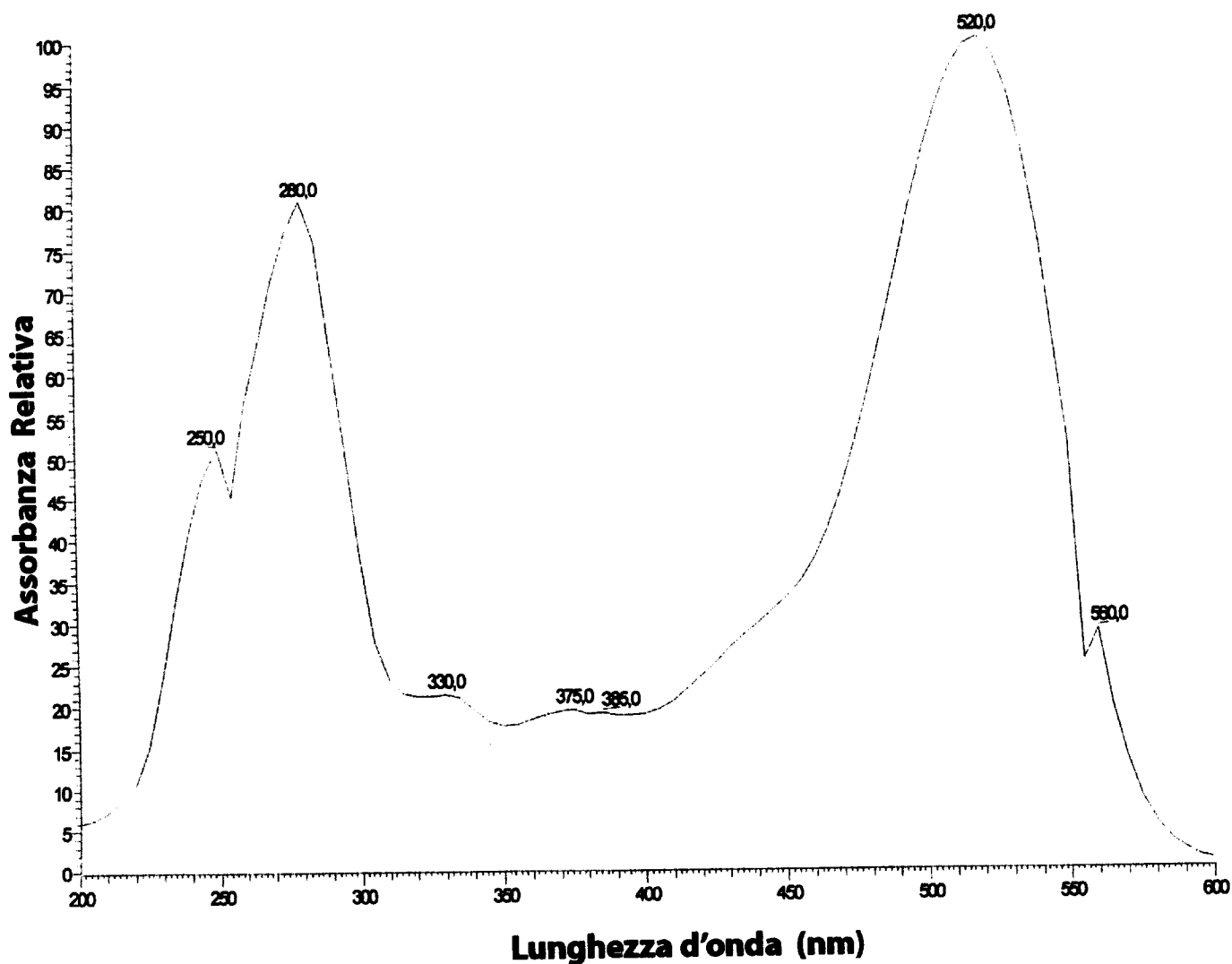
UN MANDATO  
per se e per gli altri  
Antonio Talierno  
(N° 111111)

*Talierno*

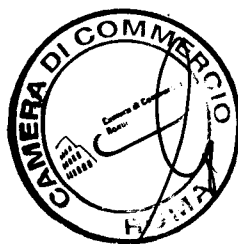
p.p.: LAZZARINO Giuseppe, TAVAZZI Barbara, LORENZI Fabrizio,  
AMORINI Angela Maria, GIARDINA Bruno, DI PIETRO Valentina  
Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

# RMV0551

3/6



**Fig. 3**



UN MANDATO CAMO  
per sé e per gli altri  
**Antonio Talerio**  
(N° 018-171)

*Talerio*

p.p.: LAZZARINO Giuseppe, TAVAZZI Barbara, LORENZI Fabrizio,  
AMORINI Angela Maria, GIARDINA Bruno, DI PIETRO Valentina  
Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.



RMV0551

4/6

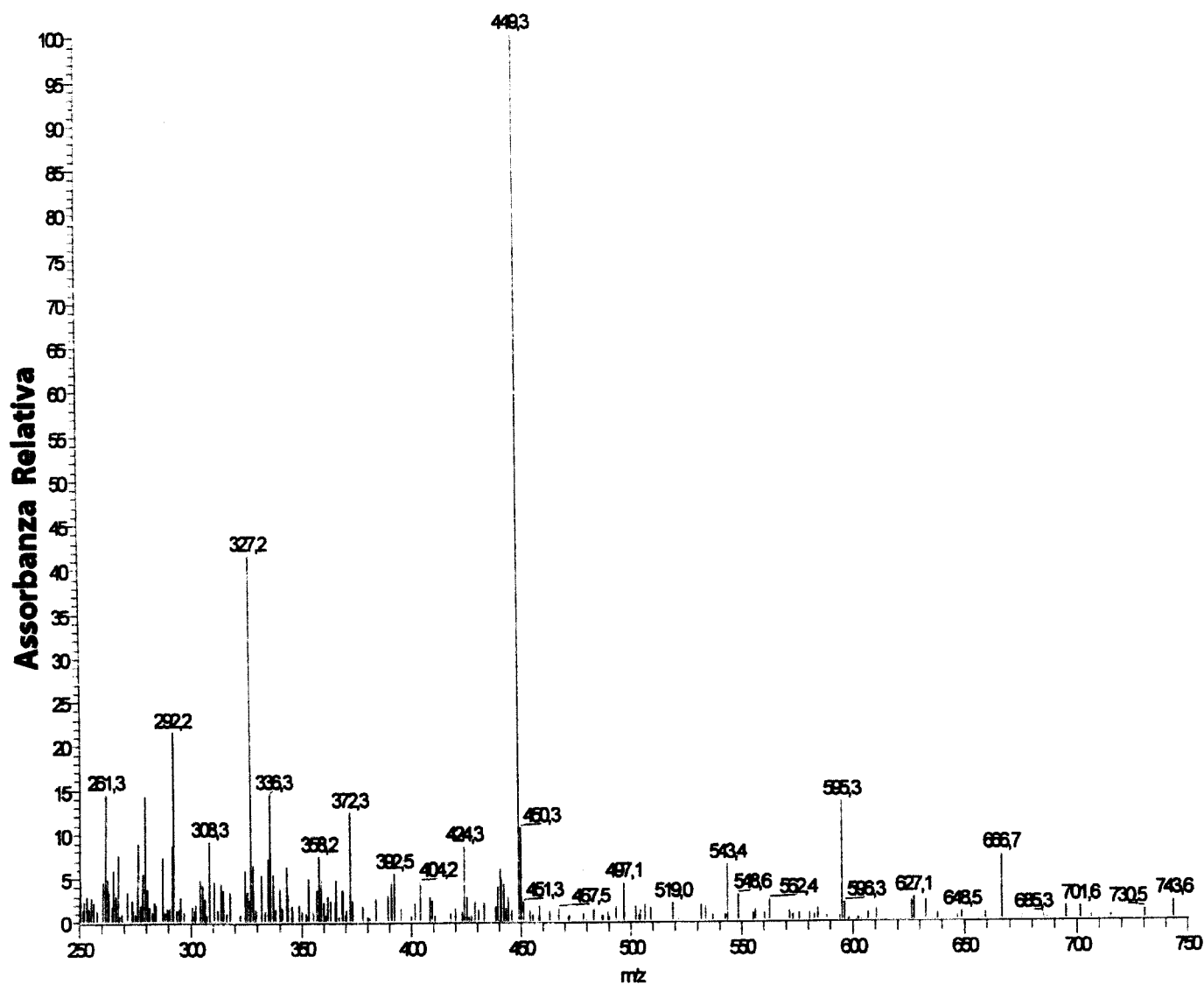


Fig. 4



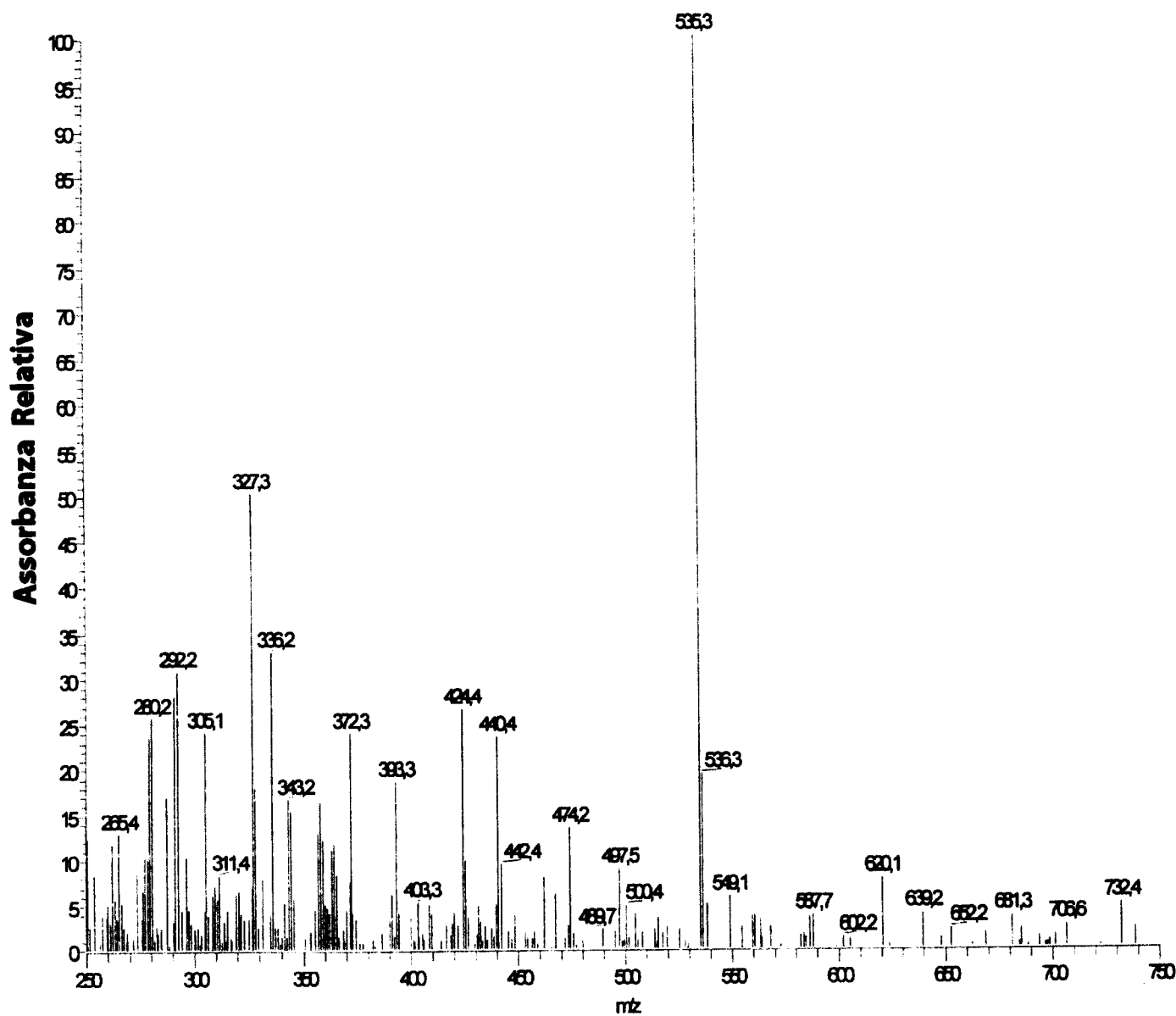
UN MANDATARIO  
per se e per gli altri  
Antonio Talierno  
(N° d'iscrizione 121)

*Talierno*

p.p.: LAZZARINO Giuseppe, TAVAZZI Barbara, LORENZI Fabrizio,  
AMORINI Angela Maria, GIARDINA Bruno, DI PIETRO Valentina  
Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

# RMV0551

5/6



**Fig. 5**



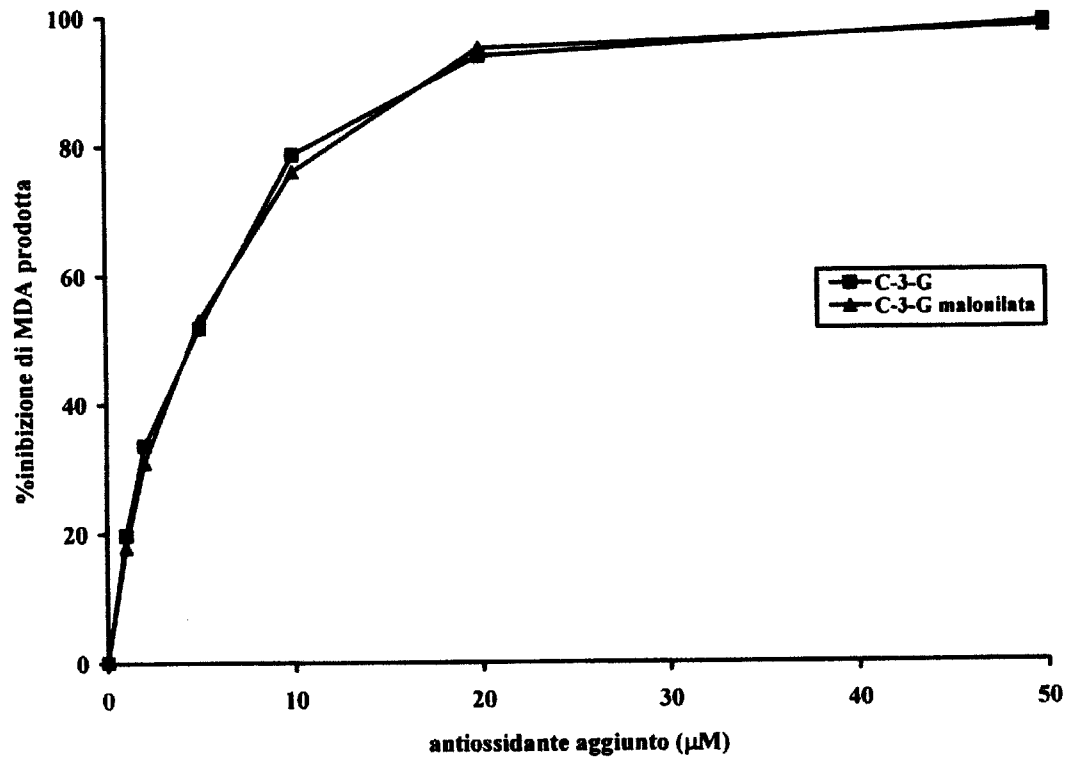
UN MANDATO  
per se e per gli altri  
Antonio Taleri  
11/10/1991

*italiano*

p.p.: LAZZARINO Giuseppe, TAVAZZI Barbara, LORENZI Fabrizio,  
AMORINI Angela Maria, GIARDINA Bruno, DI PIETRO Valentina  
Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

RMV0551

6/6



**Fig. 6**



UN MANDATO  
per sé e per gli altri  
Antonio Taliercio  
(N° d'iscrizione 173)

*Taliercio*

p.p.: LAZZARINO Giuseppe, TAVAZZI Barbara, LORENZI Fabrizio,  
AMORINI Angela Maria, GIARDINA Bruno, DI PIETRO Valentina  
Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.